

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Identification et caractérisation des cibles transcriptionnelles du facteur Yap2p chez la levure

Présenté par :  
Émilie-Anabelle Lévesque

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Dindial Ramotar  
Président-rapporteur

Dre Martine Raymond  
Directeur de recherche

Dr Malcolm Whiteway  
Membre du jury



QH

506

U54

2005

V.015

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

## RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS

Introduction : La famille des gènes *YAP* chez *Saccharomyces cerevisiae* code pour des facteurs de transcription bZip (Yeast Activating Proteins) régulant la réponse cellulaire à différents stress. La surexpression du gène *YAP2* confère la résistance au stress oxydatif causé par le cadmium ou le 1,10-phénanthroline. Cependant, les gènes impliqués et les mécanismes par lesquels Yap2p régule ses cibles ne sont pas connus. Méthodes et résultats : Nous avons utilisé la technologie des biopuces afin d'identifier des gènes dont l'expression est modulée par la surexpression de *YAP2*. Ces gènes codent entre autres pour des déshydrogénases (*AAD4*, *AAD6*, *OYE3*), des enzymes impliquées dans la voie du glutathion (*GTT2*, *GPX2*) et des transporteurs de la famille *ATP-binding cassette* (*ABC*, *YCF1*) et des facilitateurs (*FLR1*, *ATR1*). Nous avons aussi trouvé que la surexpression de *YAP2* induit fortement l'expression du gène *FRM2* (*Fatty acid Repression Mutant 2*), impliqué dans le métabolisme des acides gras et dont le produit est homologue à certaines nitroréductases bactériennes. Nos résultats montrent que l'expression de *FRM2* est induite par le diamide et que cette induction est fortement diminuée dans une souche *yap2Δ*, confirmant que la protéine Yap2p endogène régule la transcription de *FRM2* en réponse à un stress oxydatif. De plus, des expériences de transactivation ont montré que les séquences situées entre les positions -301 et -258 dans le promoteur *FRM2* sont nécessaires à sa régulation par Yap2p. Cette région contient un site potentiel YRE (*Yap Response Element*) atypique dont la mutation abolit complètement l'induction de *FRM2* par Yap2p. Finalement, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont démontré qu'en réponse à un traitement au diamide, Yap2p se lie au promoteur *FRM2* *in vivo*. Conclusion et pertinence : Nos travaux ont identifié une cible transcriptionnelle de Yap2p, soit *FRM2*. Ces connaissances serviront entre autres à mieux comprendre les interactions hôte-pathogène lors d'infections fongiques.

Mots clé : *S. cerevisiae*, stress oxydatif, bZIP, *YAP2*, *FRM2*, YRE, ChIP

## **RESUME AND KEYWORDS**

Introduction: In *S. cerevisiae*, members of the *YAP* gene family encode bZIP transcription factors (Yeast Activating Proteins) regulating the cellular response to different stresses. It has been shown that *YAP2* overexpression confers resistance to an oxidative stress caused by cadmium or 1,10-phenantroline exposure. However, the genes involved and the mechanisms by which Yap2p regulate its targets are still unknown. Methods and results: We have used DNA microarrays to identify all the genes whose expression is modulated by *YAP2* overexpression. These genes code for several dehydrogenases (*AAD4*, *AAD6*, *OYE3*), for enzymes implicated in the glutathione pathway (*GTT2*, *GPX2*) and for transporters of the ATP-binding cassette (*YCF1*) and major facilitator (*FLR1*, *ATR1*) superfamilies. We also found that *YAP2* overexpression strongly induces the expression of the *FRM2* gene (*Fatty acid Repression Mutant 2*). This gene is involved in the integration of lipid signaling pathways and its product is homologous to a number of bacterial nitroreductases. We show that *FRM2* expression is induced by diamide and that this induction is strongly reduced in a *yap2Δ* strain, confirming that the endogenous Yap2p protein regulates the transcription of *FRM2* in response to an oxidative stress. Transactivation experiments demonstrated that sequences located between positions –301 and –258 in the *FRM2* promoter are necessary for its regulation by Yap2p. This region contains a potential binding site YRE (*Yap Response Element*) atypical which, when mutated, abolished completely the induction of *FRM2* by Yap2p. Finally, chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments showed that, in response to diamide treatment, Yap2p binds to the *FRM2* promoter *in vivo*. Conclusion and relevance: Our works identify *FRM2* as a transcriptional target of Yap2p. That knowledge will help to better understand host-pathogene interactions during fungus infections.

Keywords : *S. cerevisiae*, oxidative stress, bZIP, *YAP2*, *FRM2*, YRE, ChIP

## **TABLE DES MATIÈRES**

<b>RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS .....</b>	<b>I</b>
<b>RESUME AND KEYWORDS .....</b>	<b>II</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>III</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>IX</b>
<b>CONTRIBUTION DES COLLABORATEURS .....</b>	<b>X</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION ET RECENSION DE LA LITTÉRATURE .....</b>	<b>1</b>
1.1 PRÉAMBULE .....	1
1.2 LE STRESS OXYDATIF.....	1
1.2.1 Les éléments oxygénés hautement réactifs.....	1
1.2.2 Les dommages cellulaires causés par le stress oxydatif.....	2
1.2.3 Le stress oxydatif chez l'humain .....	3
1.2.4 Le stress oxydatif et la phagocytose.....	4
1.3 ÉTUDE DU STRESS OXYDATIF CHEZ LA LEVURE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	5
1.3.1 <i>S. cerevisiae</i> , une levure modèle .....	5
1.3.2 Les systèmes de défense contre le stress oxydatif chez <i>S. cerevisiae</i> .....	6
1.3.2.1 Le système de défense non-enzymatique .....	6
1.3.2.2 Le système de défense enzymatique .....	7
1.3.3 Les facteurs de transcription régulant la réponse au stress oxydatif.....	8
1.3.3.1 Msn2p et Msn4p.....	8
1.3.3.2 Hsf1p.....	9
1.3.3.3 Yap1p et Yap2p.....	10
1.3.3.4 Skn7p.....	10
1.3.3.5 Cup2p .....	11
1.3.3.6 Mac1p.....	12
1.3.3.7 Hap1p .....	13
1.4 LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION AP-1 CHEZ <i>S. CEREVISIAE</i> .....	13
1.4.1 La famille Yaps.....	13
1.4.2 Yap1p.....	16
1.4.2.1 La réponse au stress oxydatif .....	17
1.4.2.2 La résistance pléiotropique aux drogues .....	18
1.4.2.3 La régulation de la localisation sous-cellulaire de Yap1p.....	20
1.4.2.4 Les homologues de Yap1p chez les autres levures .....	25
1.4.3 Yap2p.....	28
1.4.4 La régulation de YAP1 et YAP2 .....	29
1.5 OBJECTIFS DU PROJET .....	30
<b>CHAPITRE 2 : MÉTHODOLOGIE .....</b>	<b>32</b>
2.1 SOUCHES DE LEVURES ET CONDITIONS DE CROISSANCE UTILISÉES .....	32

2.2	PRÉPARATIONS DES SONDAS ET CONSTRUCTIONS DE PLASMIDES .....	32
2.2.1	<i>Préparations des sondes</i> .....	32
2.2.2	<i>Constructions des plasmides</i> .....	33
2.3	TESTS DE RÉSISTANCE AUX OXYDANTS .....	38
2.4	ANALYSE NORTHERN .....	38
2.5	PUCES D'ADN.....	39
2.5.1	<i>Préparation des ARN</i> .....	39
2.5.2	<i>Transcription inverse</i> .....	40
2.5.3	<i>Purification des ADNc</i> .....	40
2.5.4	<i>Préparation des marqueurs de réaction cyanines</i> .....	41
2.5.5	<i>Couplage de l'ADNc purifié aux marqueurs cyanines</i> .....	41
2.5.6	<i>Conception des biopuces</i> .....	41
2.5.7	<i>Hybridation, lavages et lecture des résultats</i> .....	42
2.5.8	<i>Analyse des résultats</i> .....	43
2.6	ESSAI $\beta$ -GALACTOSIDASE .....	43
2.7	CONSTRUCTION D'UNE SOUCHE YAP2-MYC .....	43
2.7.1	<i>Intégration d'une étiquette MYC au locus YAP2</i> .....	43
2.7.2	<i>Caractérisation de la souche par analyse Western</i> .....	47
2.8	IMMUNOPRÉCIPITATION DE LA CHROMATINE.....	48
2.8.1	<i>Jour 1 : Croissance des cellules et «cross-link» protéine-ADN</i> .....	48
2.8.2	<i>Jour 2 : Immunoprécipitation de la chromatine</i> .....	49
2.8.3	<i>Jour 3 : Récupération de l'ADN immunoprécipité</i> .....	49
2.8.4	<i>Jour 4 : Précipitation de l'ADN immunoprécipité et PCR</i> .....	50
2.8.5	<i>Jour 5 : Révélation des résultats</i> .....	51
2.9	ANALYSES BIOINFORMATIQUES.....	51
<b>CHAPITRE 3 : PRÉSENTATION ET ANALYSE DES RÉSULTATS.....</b>		<b>52</b>
3.1	IDENTIFICATION DES CIBLES TRANSCRIPTIONNELLES DE Yap2p .....	52
3.1.1	<i>Choix du système expérimental</i> .....	52
3.1.2	<i>Construction et caractérisation des souches</i> .....	53
3.1.3	<i>Expérience des puces à ADN</i> .....	56
3.1.4	<i>Validation des résultats par analyse Northern</i> .....	62
3.2	CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE DES CIBLES DE Yap2p DANS LA RÉSISTANCE AUX OXYDANTS.....	65
3.3	ÉTUDE DES MÉCANISMES DE RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE <i>FRM2</i> PAR Yap2p .....	68
3.3.1	<i>Choix du gène FRM2</i> .....	68
3.3.2	<i>Caractérisation de la régulation de l'expression du gène FRM2 par Yap2p</i> .....	69
3.3.3	<i>Régulation du promoteur FRM2 par Yap2p</i> .....	72
3.3.4	<i>Étude de la liaison de Yap2p au promoteur FRM2</i> .....	76
3.3.4.1	<i>Approche expérimentale</i> .....	76
3.3.4.2	<i>Construction et caractérisation de la souche YAP2-MYC</i> .....	77
3.3.4.3	<i>Liaison de Yap2p au promoteur FRM2 in vivo</i> .....	82
3.4	EFFET DE L'ACIDE OLÉIQUE SUR LA RÉGULATION DE FRM2p ET Yap2p SUR LE GÈNE <i>OLE1</i> .....	85
<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION .....</b>		<b>89</b>
4.1	IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DU RÉGULON Yap2p.....	89
4.1.1	<i>Identification de tous les gènes répondant à la surexpression de YAP2 biopuces</i> .....	89

4.1.1.1	Choix de l'approche expérimentale.....	89
4.1.1.2	Implication de Yap2p dans la résistance au diamide .....	93
4.1.1.3	Classification fonctionnelles des cibles potentielles de Yap2p.....	94
a)	Les transporteurs .....	94
b)	Les déshydrogénases.....	96
c)	La voie du glutathion et de la thiorédoxine.....	96
d)	L'acquisition du fer .....	97
e)	La réponse au stress oxydatif .....	98
f)	Autres.....	99
4.1.1.4	Comparaison de notre approche à une autre .....	99
4.1.2	Régulation des gènes par Yap2p et Yap1p.....	101
4.1.3	Effecteurs de Yap2p dans la réponse au stress oxydatif.....	105
4.1.3.1	Effecteur de Yap2p dans la réponse au cadmium .....	105
4.1.3.2	Effecteurs de Yap2p dans la réponse au diamide.....	105
4.2	CARACTÉRISATION DE <i>FRM2</i> , UN GÈNE RÉPONDANT À LA SUREXPRESSION DE <i>YAP2</i> .....	107
4.2.1	Mécanismes de régulation de <i>FRM2</i> par Yap2p.....	107
4.2.2	Sites de liaison de Yap2p sur le promoteur <i>FRM2</i> .....	108
4.2.3	Nouvelle fonction pour <i>Frm2p</i> .....	109
4.2.4	Implication potentielle de Yap2p dans la voie de signalisation des acides gras .....	113
<b>CHAPITRE 5 : CONCLUSION .....</b>		<b>118</b>
<b>CHAPITRE 6 : SOURCE DOCUMENTAIRE .....</b>		<b>119</b>



## **LISTE DES TABLEAUX**

Table 1. Souches de *S. cerevisiae* utilisées dans cette étude.

Table 2. Oligonucléotides utilisés pour la synthèse des sondes et la construction des plasmides.

Table 3. Oligonucléotides utilisés pour la construction d'une souche *YAP2-MYC* et pour l'expérience d'immunoprécipitation de la chromatine.

Table 4. Gènes dont l'expression est modulée suite à la surexpression de *YAP2* par rapport à sa délétion.

Table 5. Comparaison des gènes régulés par Yap1p et Yap2p et de la présence de YRE dans leur région promotrice.

## **LISTE DES FIGURES**

Fig. 1 Famille des facteurs de transcription Yaps chez la levure.

Fig. 2 Régulation de la localisation sous-cellulaire de Yap1p.

Fig. 3 Structure protéique prédite de Yap1p et Yap2p.

Fig. 4 Structure tri-dimensionnelle de la liaison de Yap1p à l'ADN.

Fig. 5 Caractérisations des souches utilisées pour les biopuces.

Fig. 6 Répartition selon la fonction des protéines codées par les gènes induits par la surexpression de *YAP2*.

Fig. 7 Confirmation par Northern blot de gènes répondant à la surexpression de *YAP2*.

Fig. 8 Tests de l'habileté de gènes répondant à la surexpression de *YAP2* à conférer la résistance à certains oxydants.

Fig. 9 Analyse par Northern blot de la régulation de *FRM2* par *YAP2*.

Fig. 10 Détermination du site de régulation du promoteur *FRM2* par Yap2p.

Fig. 11 Caractérisation des étapes ayant servi à la construction du clone *YAP2*-MYC.

Fig. 12 Caractérisation du clone *YAP2*-MYC utilisé pour les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine.

Fig. 13 Immunoprécipitation du promoteur *FRM2* par Yap2p-Myc.

Fig. 14 Analyse par Northern blot de la régulation du gène *OLE1* par *FRM2* et *YAP2* suite à un traitement à l'acide oléique.

Fig. 15 Alignement de séquences protéiques de Frm2p de *S. cerevisiae* et des nitroréductases provenant de divers miro-organismes.

Fig. 16 Modèle proposé de l'implication de Yap2p dans la voie de signalisation des acides gras.

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

µl : microlitre

µg : micromolaire

BSA : Albumine de Sérum Bovin

CLO : Cadre de Lecture Ouvert

CLOa : Cadre de Lecture Ouvert en amont

dNTP : désoxyribonucléotides tri-phosphate

DO : Densité Optique

ÉOR : Reactive Oxygen Species

HSE : Heat Shock Element

kb : kilobases

kD : kiloDaltons

ml : millilitre

mM : millimolaire

NCBI : «National Center for Biotechnology Information»

pb : paires de base

PCR : «Polymerisation Chain Reaction»

SD : «Synthetic Dextrose»

SDS : «Sodium Dodecyl Sulphate»

SGD : «*Saccharomyces* Genome Database»

STRE : STress Responsive Element

rpm : révolution par minute

YPD : «Yeast extract Peptone Dextrose»

YRE : Yap Response Element

## **REMERCIEMENTS**

Un gros merci à ma directrice de maîtrise Dre Martine Raymond, pour m'avoir donné ma chance dans son laboratoire et pour m'avoir supportée au cours de ma maîtrise. Un autre gros merci à tous les membres passés et présents du laboratoire du Dre Raymond, tout particulièrement à Sandra Weber pour son soutien technique et sa patience vénérable. Merci au Dr François Robert pour sa collaboration lors des expériences de biopuces et d'immunoprécipitation de la chromatine. Un dernier merci à ma famille et mes amis qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de ma maîtrise.

## **CONTRIBUTION DES COLLABORATEURS**

- Sandra Weber : Construction des transformants *YAP2*/p426GPD, *yap2Δ*/p426GPD, *yap2Δ*/p426GPD-*YAP2*.
- Jean-Sébastien Deneault : Extraction des ARN et expériences des biopuces.
- Dr François Robert : Adaptation de la macro utilisée pour l'analyse des résultats des biopuces. Conseiller lors des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine.
- Dre Martine Raymond : Conception des figures 1 et 4.
- Émilie-A. Lévesque : Analyse des résultats des expériences des biopuces. Construction de tous les transformants (excepté ceux construits par S. Weber). Northern blot. Western blot et tests de résistance aux oxydants. Essais  $\beta$ -galactosidase et immunoprécipitation de la chromatine. Analyses bioinformatiques. Conception de toutes les figures excepté les figures 1 et 4.

Les résultats présentés dans ce mémoire feront l'objet d'un manuscrit qui sera soumis pour publication dans le «Journal of Biological Chemistry».

## **CHAPITRE 1 : INTRODUCTION ET RECENSION DE LA LITTÉRATURE**

### **1.1 Préambule**

La croissance et les activités métaboliques d'une cellule sont régulées en grande partie par son bagage génétique. Cependant, ces activités sont également fonction de la composition du milieu et d'autres paramètres tels la température, le pH, les quantités d'oxygène et de sel, la présence d'éléments toxiques, etc. Des conditions différentes des conditions physiologiques peuvent être considérées comme un stress et sollicitent une réponse rapide. Une cellule peut rencontrer plusieurs types de stress dans son environnement tout comme lors de l'infection d'un hôte. Ainsi un stress provoqué par une hausse ou une baisse de température, un stress oxydatif, osmotique ou résultant de la présence d'agents chimiques sont des événements stressants auxquels les cellules doivent régulièrement faire face. De plus, chaque stress provoque une réponse cellulaire distincte. Dans plusieurs cas, la réponse au stress peut conduire à la tolérance ou à la résistance à ce stress. Ce phénomène est considéré comme un mécanisme de défense à long terme contre des agents dommageables.

### **1.2 Le stress oxydatif**

#### *1.2.1 Les éléments oxygénés hautement réactifs*

Un des stress fréquemment rencontrés par une cellule aérobie est le stress oxydatif. Les organismes aérobies ont à maintenir un environnement cellulaire réduit afin de faire face aux conditions pro-oxydantes de la vie aérobie. Par exemple, celui-ci peut être provoqué par la présence de produits oxydants dans l'environnement, ou bien, dans le cas des micro-organismes pathogènes, dans une cellule-hôte lors de la phagocytose. Un stress oxydatif est généralement déclenché lorsque le niveau d'éléments oxygénés hautement réactifs (ÉOR, «reactive oxygen species») est supérieur à la limite tolérée par la cellule. L'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyl ( $OH^\cdot$ ) et l'oxyde nitrique (NO) sont des exemples d'ÉOR. En conditions physiologiques, les ÉOR sont générés à un niveau tolérable par le

métabolisme de la cellule lors de la respiration dans les mitochondries et la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans les peroxisomes (59). Ces processus permettent aux organismes aérobiques d'acquérir de l'énergie. L'oxygène moléculaire est réduit en  $H_2O$  par l'acceptation de quatre électrons. Pendant cette réduction, plusieurs ÉOR sont formés en acceptant un ( $O_2^{\cdot -}$ ), deux ( $H_2O_2$ ) ou trois électrons ( $OH^{\cdot}$ ) (59). Une production excessive d'ÉOR peut être une conséquence de la présence de composés pro-oxydants dans le milieu (exemple:  $H_2O_2$ , ménadione etc.) ou d'une exposition des cellules aux radiations ionisantes (91). Les défenses anti-oxydantes de la cellule confèrent seulement une capacité limitée à résister à une soudaine agression oxydante. Afin de survivre, les cellules doivent ainsi induire rapidement ces défenses tout comme d'autres facteurs de protection telles les protéines de stress. Une réponse au stress oxydatif est déclenchée aussitôt que la cellule ressent une augmentation d'ÉOR trop importante. En général, les défenses cellulaires primaires opèrent pour neutraliser les ÉOR alors que les défenses secondaires réparent ou enlèvent les produits causés par l'oxydation sur l'ADN, les protéines et les lipides (91).

### *1.2.2 Les dommages cellulaires causés par le stress oxydatif*

Les cellules doivent se protéger contre les dommages cellulaires engendrés par le stress oxydatif. Ces dommages comprennent les bris à l'ADN, la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines (25). Les dommages oxydatifs causés à l'ADN et aux nucléoprotéines touchent les bases et les sucres. Il s'agit entre autres des bris simple brin, des sites abasiques et des «cross-link» entre l'ADN et les protéines. Un des produits majeurs de dommages aux bases est le 8-hydroxyguanine et est détectable dans les cellules exposées à une concentration létale de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). La peroxydation des lipides abîme l'intégrité structurale des membranes en générant des chaînes d'acides gras plus courtes, augmentant ainsi la fluidité des membranes. Ceci permet aux éléments toxiques de pénétrer dans le cytoplasme ou dans les organelles. Les ÉOR peuvent également attaquer les double liens des acides gras insaturés tels l'acide arachidonique et l'acide linoléique, générant des radicaux lipidiques hautement réactifs qui initieront une réaction en chaîne d'une succession d'attaques sur d'autres acides gras insaturés. Aussi, une concentration élevée de  $H_2O_2$  intensifie la formation de malondialdéhyde résultant de la peroxydation des lipides. Celui-ci est directement relié au degré d'insaturation des

acides gras présents dans la membrane (128). Enfin, quelques éléments produits par la peroxydation des lipides tels les époxydes, les aldéhydes et les alcanes, sont capables d'endommager l'ADN et d'inactiver les protéines, causant encore plus de dommages à la cellule (47). Les dommages aux protéines incluent l'oxydation des acides aminés (histidine, arginine, lysine, proline, méthionine et cystéine) et des «cross-link» de protéines menant à une augmentation de la susceptibilité protéolytique et à une baisse de l'activité biologique (81).

### *1.2.3 Le stress oxydatif chez l'humain*

Le stress oxydatif est associé à de nombreuses maladies neurodégénératives chez l'humain. En effet, une consommation élevée d'oxygène, relative à un niveau bas d'antioxydants et de faibles capacités régénératives a pour conséquence d'augmenter la susceptibilité des tissus du cerveau à subir les dommages causés par le stress oxydatif. Les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique et l'ataxie de Friedreich sont définies par la perte progressive de populations de cellules neuronales spécifiques et sont associées à la formation d'agrégats de protéines. Un point commun à ces maladies est l'implication du stress oxydatif. En effet, celui-ci serait à l'origine du mauvais fonctionnement et de la mort des cellules neuronales, contribuant ainsi à la pathogénicité des maladies (6). Par exemple, il devient de plus en plus clair que le stress oxydatif observé chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer origine d'un fonctionnement anormal des mitochondries. En relâchant une trop grande quantité de  $H_2O_2$ , les mitochondries anormales enclenchent une série d'interactions entre les métaux réduits et les éléments de la réponse au stress oxydatif. Ces interactions provoquent par la suite des dommages considérables à des macromolécules telles que l'ADN, les protéines et les lipides (162).

Afin d'être efficace pour le traitement des maladies neurodégénératives, un médicament doit être en mesure de traverser la barrière sang-cerveau. Cette barrière est composée de microvaisseaux de cellules endothéliales de cerveaux qui s'assurent que les métabolites neurotoxiques sont exclus tout en laissant passer les nutriments essentiels. Cette barrière représente donc la jonction entre le sang et l'environnement neuronal et est relativement imperméable aux



fluctuations de niveau de cuivre, de fer et de zinc du sang. Par conséquent, les anti-oxydants sont des molécules idéales pour le traitement de ces maladies puisqu'ils font partie de notre diète normale et peuvent également traverser la barrière sang-cerveau. De plus, ces molécules réagissent préférentiellement avec les ÉOR pour les inactiver. Quelques études ont déjà montré l'efficacité de la vitamine E pour le traitement de la maladie d'Alzheimer à court terme (120). Ces derniers faits soulignent bien la portée du stress oxydatif dans nos vies et sa compréhension nous aidera à trouver des cibles pour la conception de nouveaux médicaments.

#### *1.2.4 Le stress oxydatif et la phagocytose*

Un défi majeur rencontré par les microorganismes pathogènes dans une cellule-hôte est d'échapper à la première ligne de défense du système immunitaire, c'est-à-dire la phagocytose. L'humain possède également des systèmes de défense qui n'impliquent pas le système immunitaire. Ceux-ci incluent la barrière créée par la peau et les muqueuses, la compétition des pathogènes avec la flore bactérienne normale, les mécanismes de dégagement des cils et les produits fongistatiques présents dans le sérum (82). Cependant, la phagocytose demeure la voie la plus efficace et la plus rapide de se débarrasser des levures pathogènes. Celle-ci peut avoir lieu dans les cellules dendritiques, les macrophages et les neutrophiles (85). Une fois le microorganisme emprisonné dans le phagocyte, le processus de la phagocytose est rapidement enclenché. Les mécanismes par lesquels le phagocyte tue les pathogènes se divisent en deux catégories, soit dépendant ou indépendant de l'oxygène. Le mécanisme de défense dépendant de l'oxygène détruit les microorganismes par une exposition à une dose élevée d'ÉOR. Le processus est simple. Premièrement, l'oxydase de NADPH est activée, ce qui amène la production d'anions superoxydes fongicides. L'efficacité de ces anions est de courte durée puisque ceux-ci se combinent rapidement à l'hydrogène pour former du  $H_2O_2$ , également fongicide mais dont l'activité est plus faible. Les phagocytes possèdent également l'enzyme myéloperoxydase enfermée dans des granules. Suite à l'enclenchement de la phagocytose, les granules relâchent la myéloperoxydase. Cette dernière catalyse des réactions impliquant le  $H_2O_2$  et les ions halides, ayant pour conséquence la formation de produits toxiques tels l'acide hypochloré et le chloramine. Pour finir, les lysozymes, les lactoferrines, les protéases de sérine et

les défensines font partie du mécanisme de défense indépendant de l'oxygène. Cependant, les mécanismes dépendants de l'oxygène semblent contribuer davantage à la protection contre les pathogènes que les mécanismes indépendants de l'oxygène (99). En définitive, l'habilité des microorganismes pathogènes à résister au stress oxydatif leur permet de survivre et de se reproduire à l'intérieur du phagocyte (94). Aussi, la caractérisation des mécanismes par lesquels la cellule perçoit les ÉOR produits par un stress environnemental ou la phagocytose permettra de mieux adapter les médicaments conçus pour tuer les pathogènes des mammifères et des végétaux.

### 1.3 Étude du stress oxydatif chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

#### 1.3.1 *S. cerevisiae*, une levure modèle

Somme toute, il est aisé de conclure que l'étude des mécanismes de réponse au stress oxydatif est d'une importance considérable puisque celui-ci est une conséquence fondamentale de la vie aérobie. Aussi, l'apparition de plus en plus fréquente de résistance aux fongicides chez les levures pathogènes rend laborieuse l'élaboration de médicaments efficaces à long terme. Or, l'étude de la réponse au stress oxydatif est grandement facilitée par l'emploi de la levure *S. cerevisiae*. En effet, cet organisme est souvent utilisé pour son caractère versatile. Le séquençage de son génome est complété et annoté, l'obtention de mutants est très simple comparativement aux eucaryotes supérieurs et les outils génétiques et de biologie moléculaire sont diversifiés. De plus, les études à grande échelle utilisant des approches de génomiques et de protéomiques fonctionnelles et employant cette levure sont très bien développées. De même, *S. cerevisiae* produit une grande variété d'enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydatif et ayant des homologues chez les eucaryotes supérieurs. La catalase, la superoxyde dismutase, la peroxydase de glutathion et les petites molécules glutathion et thiorédoxine participant à la détoxification des ÉOR, font partie de ce nombre. En définitive, les résultats obtenus par l'étude de la réponse et de la résistance au stress oxydatif chez *S. cerevisiae* pourront être transposés chez les levures pathogènes et même chez les eucaryotes supérieurs.

### 1.3.2 Les systèmes de défense contre le stress oxydatif chez *S. cerevisiae*

La levure possède des systèmes de défense enzymatiques et non-enzymatiques afin de protéger ses constituants cellulaires contre les ÉOR et maintenir un niveau de réduction adéquat.

#### 1.3.2.1 Le système de défense non-enzymatique

Le système de défense non-enzymatique consiste en de petites molécules hydrophiles ou lipophiles oxydées par les ÉOR et agissant ainsi comme agents complexant les radicaux. Les exemples les plus typiques sont le glutathion, les thiorédoxines, la flavohémoglobine et l'acide ascorbique. Chez *S. cerevisiae*, le glutathion est synthétisé en deux étapes. Premièrement, Gsh1p catalyse la liaison du glutamate à la cystéine formant le gamma-glutamylcystéine. Par la suite, la synthétase de glutathion Gsh2p lie cette molécule à la glycine, constituant ainsi le glutathion. Ce dernier agit en réduisant les liaisons disulfides conjointement avec les protéines glutarédoxines (130). Il est également un donneur d'électron pour l'enzyme peroxydase de glutathion. Le glutathion est possiblement la plus importante molécule de réduction dans la cellule. Conséquemment, son rôle dans le maintien de l'état cellulaire réduit est essentiel (65). De la même manière, les thiorédoxines sont des oxydoréductases de liens disulfides et des donneurs d'électrons pour les peroxydases de thiorédoxines (18). *S. cerevisiae* possède trois gènes codant pour des thiorédoxines : *TRX1*, *TRX2* et *TRX3*. La flavohémoglobine Yhb1p est une protéine contenant un élément métal et joue probablement un rôle dans la protection contre le stress oxydatif. En effet, la délétion de *YHB1* rend la cellule sensible aux oxydants tel le diamide tandis que l'expression du gène est induite par la présence d'oxygène (160). L'acide ascorbique, quant à lui, est depuis longtemps connu comme un anti-oxydant important chez les eucaryotes supérieurs, particulièrement chez les plantes. Chez la levure, quelques articles démontrent son importance mais son rôle précis n'a pas encore été élucidé (51).

De plus, la composition lipidique des membranes est importante dans la résistance au stress oxydatif. Les cellules contenant un niveau élevé d'acides gras saturés deviennent plus résistantes que celles renfermant un niveau élevé d'acides gras insaturés (55;128). Aussi, il est clair qu'il existe un lien direct entre les ions métaux et la sensibilité/résistance aux oxydants. Des

mutations dans plusieurs gènes donnent naissance à l'hypersensibilité ou à la résistance à la fois aux ions métaux et aux oxydants. Cette relation est cohérente puisque plusieurs oxydants contiennent des ions métaux tels le  $\text{Cu}^+$  et le  $\text{Fe}^{2+}$  dans leur structure, produisant ainsi une réponse coordonnée au stress oxydatif et à la présence de métaux. Finalement, les métallothionéines sont une classe de petites protéines riches en cystéines possédant des propriétés anti-oxydantes et capables de lier plusieurs ions métaux comme le zinc, le cuivre et le cadmium afin de réduire leur concentration à un niveau non toxique (48:159). Elles sont induites par plusieurs stimuli, notamment les métaux lourds et le stress oxydatif.

### 1.3.2.2 Le système de défense enzymatique

Le système de défense enzymatique comprend des enzymes capables de déplacer un radical oxygéné et ses produits dérivés et aussi de réparer les dommages causés par un stress oxydatif. Il s'agit entre autres des catalases, des superoxyde dismutases, des peroxydases et des réductases de thiorédoxines et de glutathion (65). Les catalases catalysent la dégradation du  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ . *S. cerevisiae* possède deux catalases, la catalase A et T, codées par les gènes *CTA1* et *CTT1*, respectivement. La catalase A est localisée dans les peroxisomes et son rôle précis est la réduction du  $\text{H}_2\text{O}_2$  produit par la  $\beta$ -oxydation des acides gras. La catalase T est cytosolique et son rôle est moins bien détaillé. Néanmoins, il semble que l'expression de *CTT1* soit régulée par le stress oxydatif ou osmotique. Les cellules de levures, tout comme les autres eucaryotes, possèdent deux superoxydes dismutases, soient MnSod qui est mitochondriale (encodée par le gène *SOD2*) et Cu/ZnSod localisée dans le cytoplasme (encodée par le gène *SOD1*). Ces deux métallo-enzymes de cuivre effectuent une réaction de dismutation sur les anions superoxydes résultant en la formation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et de  $\text{O}_2$ . La Cu/ZnSod semble être l'enzyme majeure pour enlever les anions superoxydes dans le cytoplasme et possiblement dans le peroxisome alors que le rôle physiologique de la MnSod serait de protéger la mitochondrie contre les superoxydes générés pendant la respiration (42:66).

Les thiorédoxines peroxydases (Tsa1p et Tsa2p) réduisent le  $\text{H}_2\text{O}_2$  et l'hydroperoxyde alkylé conjointement avec les thiorédoxines réductases (Trr1p et Trr2p), la thiorédoxine et le NADPH (20:102). La réductase de glutathion Glr1p est responsable de la réduction du glutathion

oxydé et du maintien d'un ratio adéquat de glutathion oxydé et réduit (97). Les peroxydases de glutathion Gpx1p et Gpx2p catalysent la réduction des hydroperoxydes en utilisant le glutathion comme agent réducteur. Finalement, les enzymes impliquées dans la voie du pentose phosphate sont aussi des éléments importants dans la réponse au stress oxydatif. En effet, ces enzymes sont cruciales dans la production du NADPH, possédant une puissance réductrice indispensable. Tel que mentionné plus haut, les réductases de glutathion et de thiorédoxine utilisent le NADPH comme potentiel réducteur afin de réduire le glutathion et la thiorédoxine (67).

### 1.3.3 Les facteurs de transcription régulant la réponse au stress oxydatif

Il existe deux systèmes de réponse aux stress chez *S. cerevisiae*. Différents facteurs de transcription régulent ces deux systèmes de défense: la réponse à un stress général est contrôlée par Msn2p/Msn4p alors que des réponses à des stress plus spécifiques sont régulées par Hsf1p, Yap1p, Yap2p, Skn7p, Cup2p, Mac1p et Hap1p (17;25).

#### 1.3.3.1 Msn2p et Msn4p

En premier lieu, la levure possède des mécanismes moléculaires de défenses globales lorsqu'elle est confrontée à divers stress comme le choc thermique, l'éthanol, les ions métalliques, une haute concentration d'oxydants ou de sel (25). La réponse au stress général est régulée par les deux facteurs de transcription homologues Msn2p et Msn4p. Ces facteurs de transcription à doigt de zinc lient des séquences d'ADN nommées STRE pour «*Stress Response Element*», CCCCT. Ces éléments sont présents dans les séquences promotrices de plusieurs gènes activés par des changements environnementaux et codant entre autres pour des transporteurs, des protéases et des enzymes participant au métabolisme du carbone (32). Msn2p et Msn4p sont donc impliquées dans la réponse aux stress oxydatif et osmotique, au choc thermique et à la déplétion en carbone. Elles agissent en arrêtant la croissance tout en permettant de survivre en présence de conditions sévères. Le double mutant *msn2Δmsn4Δ* montre une sensibilité comparativement à la souche sauvage lorsque les cellules sont en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De plus, une comparaison de gels en deux dimensions, réalisés avec des extraits sauvages et

*msn2Δmsn4Δ* traités au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a montré que Msn2p et Msn4p régulent des gènes impliqués dans les voies de dégradation liées à l'ubiquitine et au protéasome ainsi que des gènes codant pour des chaperones et des protéines de choc thermique en réponse au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les auteurs de cet article proposent que Msn2p et Msn4p seraient des protéines importantes lors du rétablissement des cellules qui ont subi un stress oxydatif en permettant la réparation ou la dégradation des substrats endommagés et/ou la réinitialisation des voies métaboliques (50).

Msn2p/Msn4p semblent également régulées par le système à deux composants Sln1p/Ssk1p. La transduction du signal dans un système à deux composants fonctionne évidemment grâce à deux protéines : un senseur lié à la membrane cytoplasmique qui surveille les paramètres environnementaux et un régulateur localisé dans le cytoplasme qui contrôle la réponse cellulaire. Il a été démontré que la cascade engendrée par l'activation de Sln1p est également régulée par le stress oxydatif suite à une exposition au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aussi, Hog1p est capable d'activer directement Msn2p/Msn4p, s'ensuivant une réponse générale au stress (125). Il semble que la voie Hog chez *C. albicans* soit également impliquée dans la réponse au stress oxydatif (2).

#### 1.3.3.2 Hsf1p

Cette protéine agit en condition de choc thermique, par exemple lorsque l'environnement de la levure passe d'une température de 25°C à 38°C. Cette protéine essentielle est formée d'un domaine de liaison à l'ADN hélice-tour-hélice et d'un domaine répété hydrophobe. Elle lie les séquences d'ADN HSE pour «*Heat Shock Element*» composées d'au moins trois répétitions de AGAAn et régule l'expression des protéines de choc thermique (36). Ces protéines comprennent entre autres la famille des Hsp70p, qui sont des chaperones moléculaires impliquées dans le transport et le repliement des polypeptides et Hsp104p qui protège la cellule contre une exposition létale à un choc thermique (26;113;119). Plusieurs promoteurs de gènes impliqués dans la réponse au stress thermique possèdent à la fois un STRE et un HSE signifiant qu'ils sont régulés simultanément par Msn2p/Msn4p et Hsf1p (32). Par exemple, l'analyse de l'expression induite par le stress des gènes *HSP26* et *HSP104* a révélé que la contribution de Hsf1p et de Msn2p/Msn4p est différente dépendamment du gène et de la condition de stress (3). Alors que la voie de signalisation Ras/PKA a un effet négatif sur Msn2p/Msn4p, elle n'a aucun effet sur

Hsf1p, suggérant une régulation différente de ces trois types de facteurs de transcription (14). Chez *S. cerevisiae*, Hsf1p lie en complexe trimérique. Ce dernier lie constitutivement les HSEs sur les sites de haute affinité et inductiblement sur les sites de plus basse affinité (40). Finalement, Hsf1p semble également impliquée dans la résistance au cuivre et au cadmium en régulant l'expression de *CUP1*, gène codant pour une métallothionéine (124).

#### 1.3.3.3 Yap1p et Yap2p

Deux protéines importantes impliquées dans la réponse au stress oxydatif est Yap1p et Yap2p («*Yeast Activating Protein*»). Elles stimulent l'expression de classes de gènes spécifiques en réponse à une variété remarquable de stimuli intra- et extra-cellulaires. Yap1p joue un rôle dans la résistance pléiotropique aux médicaments et la réponse au stress oxydatif alors que Yap2p semble uniquement impliquée dans la réponse au stress oxydatif (35;129). Ces facteurs de transcription sont formés d'un domaine bZIP constitué d'une fermeture éclair de leucines permettant la dimérisation et d'une région basique qui interagit spécifiquement avec les séquences d'ADN (132). Cette famille est conservée parmi tous les eucaryotes. Parmi les membres les plus importants chez l'humain, on retrouve les protéines FOS, JUN et ATF. Yap1p régule l'expression de ses cibles en se liant aux séquences TTAGTAA, TTAGTCA et TGACTAA situées au niveau de leur séquence promotrice (103). Quant à elle, Yap2p semble uniquement capable de lier la séquence TTAGTAA présente dans le promoteur de ses cibles (35). Ces deux facteurs seront traités en détail à la section 1.4.

#### 1.3.3.4 Skn7p

Un facteur de transcription majeur dans la réponse au stress oxydatif et osmotique est Skn7p. Ce facteur est normalement impliqué dans la biosynthèse de la paroi cellulaire et dans le cycle cellulaire en activant l'expression de la cycline G1 (77). Skn7p est formé d'un domaine de liaison à l'ADN hélice-tour-hélice homologue à celui de Hsf1p séparé d'un motif receveur par une structure en super hélice encore similaire au domaine en fermeture éclair de leucines de Hsf1p (112). Ce domaine receveur potentiel est homologue à la famille de protéines traduisant le signal à deux composants (92). Chez les bactéries, ce système est communément utilisé pour

détecter et répondre aux changements de l'environnement (13). De plus, Skn7p participe à la réponse au stress osmotique en étant activée par le système à deux composants Sln1p/Ssk1p. Elle agit en activant la transcription du gène *OCH1*, jouant un rôle dans la maturation de glycoprotéines (83). Cependant, une séquence consensus favorisant la liaison du facteur de transcription Skn7p n'a pas encore été identifiée.

Skn7p est principalement impliquée, conjointement avec Yap1p, dans la tolérance et de la résistance au  $H_2O_2$ . Par exemple, ces deux facteurs régulent l'expression de la thiorédoxine Trx2p en se liant à deux sites distincts sur son promoteur (92). Étonnamment, il a également été noté que Skn7p et Yap1p pouvaient agir comme suppresseur de mutations, tel que montré par une étude faite sur l'ensemble du génome (56). Finalement, il a été démontré que Skn7p pouvait aussi interagir avec la protéine de choc thermique Hsf1p (94). Ces deux protéines interagissent et coopèrent afin d'enrichir l'induction des gènes de réponse au stress thermique suite à un stress oxydatif.

De plus, Skn7p peut interagir avec elle-même et est localisée au noyau en conditions normales tout comme en condition de stress oxydatif (112). Aussi, il a été démontré que Skn7p protège le facteur de transcription en doigt de zinc Crz1p de la dégradation en se liant à lui et à la calcineurine par son domaine de liaison à l'ADN. La calcineurine est une phosphatase activée par le  $Ca^{2+}$  et permet à la cellule de s'adapter à un environnement stressant provoqué par la présence d'ions ou un stress causé par une variation de pH ou par la présence de phéromones (147). Finalement, la réponse au stress oxydatif contrôlée par Skn7p est régulée négativement par la voie Ras/PKA via la diminution de la transcription de *SKN7* (21).

#### 1.3.3.5 Cup2p

Un autre facteur de transcription régulant la réponse au stress est Ace1p aussi appelé Cup2p. Ace1p sert de senseur de cuivre. Tel que mentionné précédemment, un lien direct existe entre la présence de métaux tel le cuivre dans l'environnement et la réponse au stress oxydatif (voir section 1.3.2.1). Lorsque la cellule est en présence d'une concentration trop élevée de cuivre, la conformation de Ace1p change puisque l'ion zinc lié à la protéine est remplacé par un



ion cuivre permettant ainsi à la protéine d'activer ses cibles (148). Celle-ci active ses cibles en liant leur promoteur au niveau de l'élément de régulation aux métaux 5'-HTHNNNGCTGC-3' (D = A, G ou T, H = A, C ou T, N = n'importe quel résidu). La région GCTG est appelée la région essentielle alors que la région 5' est habituellement riche en résidus T (8). Cette protéine régule l'expression de la métallothionéine Cup1p qui détoxifie la cellule. Cup1p confère également la résistance au cuivre et au cadmium (110). Ace1p régule aussi l'expression de Crs5p, une protéine capable de lier directement les ions métalliques toxiques. Crs5p est fortement homologue aux métallothionéines de mammifères et à Cup1p, à un plus bas niveau. Crs5p confère également la tolérance au cuivre mais à un niveau inférieur à Cup1p. Ceci est probablement dû à la présence, dans le promoteur de *CUP1*, de quatre éléments de régulation par le cuivre alors que le promoteur de *CRS5* n'en contient qu'un seul (110). Néanmoins, ces deux protéines agissent de façon similaire en séquestrant les ions cuivre. Ace1p régule enfin l'expression de la superoxyde dismutase cytoplasmique Cu/ZnSod (encodée par le gène *SOD1*) (109). Tel qu'énoncé ci-haut, Cu/ZnSod élimine les anions superoxydes du cytoplasme, diminuant ainsi le stress oxydatif dans la cellule.

#### 1.3.3.6 Mac1p

Mac1p est un autre facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress. La région N-terminale de Mac1p est hautement similaire au domaine de liaison à l'ADN et au domaine cuivre de Cup2p. Mac1p est impliquée dans la sensibilité des ions métalliques et est localisée au noyau. Cette protéine active ses cibles lorsque la cellule est déficiente en cuivre. Les mécanismes exacts sont peu connus. Cependant, l'absence de Mac1p provoque une inhibition du transport du cuivre (68). Mac1p lie en homodimère à la séquence promotrice de ses cibles, TTTGCTCA. Deux répétitions de cet élément sont nécessaires pour l'activité, bien que l'espacement ou l'orientation de ces deux éléments n'apparaissent pas critiques (44). Mac1p régule entre autre la transcription basale de *FRE1*, codant pour une protéine impliquée l'acquisition du fer. Mac1p est parallèlement impliquée dans l'induction de la transcription de *CTT1* codant pour la catalase T, en réponse au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (68). Tout cela suggère que *MAC1* code pour un facteur de transcription requis pour la transcription des gènes à un niveau basal et impliqué dans la réponse au stress oxydatif.

### 1.3.3.7 Hap1p

L'hème est une molécule clé contrôlant l'effet de l'oxygène sur diverses molécules et processus cellulaires dans plusieurs organismes. Chez *S. cerevisiae*, l'hème sert de signal secondaire à la présence d'oxygène. D'ailleurs, la synthèse d'hème corrèle directement avec la tension d'oxygène dans l'environnement. Chez la levure, le senseur d'oxygène et la voie de signalisation de l'hème sont régulés par la protéine activatrice Hap1p qui, en réponse à l'hème, active la transcription de gènes requis pour la respiration et le contrôle des dommages causés par le stress oxydatif (158). Ces gènes codent entre autres pour Cyc1p, un cytochrome *c-iso-1*, la catalase T, la flavohémoglobine Yhb1p et la superoxyde dismutase MnSod. Hap1p active également la transcription des gènes *ROX1* et *MOT3*, qui répriment l'expression des gènes hypoxiques sous des condition aérobiques (54). Hap1p lie la séquence consensus CCGN<sub>3</sub>TANCGGN<sub>3</sub>TA (46). Il a également été démontré que Hap1p pouvait jouer un rôle dans la régulation de la répression en absence d'hème (111). Récemment, il a été établi que la chaperone Hsp90p favorise le changement conformationnel nécessaire à Hap1p afin d'induire l'expression de ses cibles (76).

## **1.4 Les facteurs de transcription AP-1 chez *S. cerevisiae***

### *1.4.1 La famille Yaps*

La famille des facteurs de transcription AP-1 est composée de 8 membres appelés Yap 1 à 8, qui possèdent différents niveaux de similarité et d'identité entre elles (fig.1, et (156)). Lorsqu'elles sont surexprimées, elles confèrent la résistance à une variété de composés incluant des agents oxydants, chimiothérapeutiques ou antimalariques ainsi que le sel. L'émergence de résistance aux médicaments chez les levures pathogènes a incité les chercheurs à examiner les gènes pouvant contribuer à cette résistance. La résistance à la cisplatine, un agent chimiothérapeutique largement utilisé dans le traitement du cancer des ovaires et d'autres tumeurs, a été étudiée chez *S. cerevisiae* (38). Cette résistance semble toujours être

**Fig. 1 Familles des facteurs de transcription Yaps chez la levure.**

Arbre phylogénétique représentant l'homologie de séquences des domaines bZIP des facteurs de transcription de la famille Yaps chez *S. cerevisiae*. Les phénotypes de résistances énumérés sont conférés par la surexpression des facteurs de transcription (adapté de (156)).

<u>Dendrogramme</u>	<u>Protéine</u>	<u>CLO</u>	<u>Phénotype de résistance</u>
	<b>Yap1p</b>	YML007w	Fluconazole, 4-nitroquinoline N-oxyde, cycloheximide, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , diamide, diéthylmaleate, <i>tert</i> -butylhydroperoxyde, ménadione, bénomyle, sulfonate de méthylméthane, cadmium
	<b>Yap2p</b>	YDR423c	1,10-Phénanthroline, cadmium, cycloheximide
	<b>Yap3p</b>	YHL009c	?
	<b>Yap5p</b>	YIL018w	?
	<b>Yap7p</b>	YOL028c	?
	<b>Yap4p</b>	YOR028c	Quinidine, méfloquine, chloroquine, cisplatine, sulfonate de méthylméthane, mitomycine C, NaCl
	<b>Yap6p</b>	YDR259c	Cisplatine, sulfonate de méthylméthane, mitomycine C, NaCl
	<b>Yap8p</b>	YPR199c	Arsenite, arsenate

multifactorielle. Les facteurs impliqués ralentissent la capture de la cisplatine, augmentent la vitesse des systèmes de détoxification cellulaire impliquant le glutathion et les métallothionéines et accroissent la réparation de l'ADN. Les gènes *YAP4* et *YAP6*, lorsque surexprimés, confèrent la résistance à la cisplatine et à d'autres agents alkylant l'ADN tels le sulfonate de méthylméthane et la mitomycine C (38). En somme, ces deux facteurs de transcription semblent donc protéger la cellule contre les agents alkylant par un même mécanisme. Quatre facteurs de transcription incluant Yap6p et Yap7p sont responsables de la tolérance au sel et au lithium. Cette augmentation de la tolérance est régulée en partie par l'augmentation de l'expression du gène *ENAI*, codant pour une pompe  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  (88).

La résistance à la quinidine, la méfloquine et la chloroquine, des agents anti-malariques, peut être conférée par la surexpression du gène *YAP4*. Celui-ci semble également jouer un rôle dans la stabilité des chromosomes (35). Yap8p (aussi nommée Acr1p) agit dans le métabolisme de l'arsenite. En effet, sa surexpression, conjointement avec celle de *ACR2* (*ARR2*) et *ACR3* (*ARR3*), cause la résistance à l'arsenite alors que sa délétion provoque l'hypersensibilité à l'arsenite et l'arsenate (10). De plus, il a été démontré que Yap8p est constitutivement localisée au noyau et est associée au promoteur de *ACR3* en condition non stressante de même qu'en condition de stress causée par l'exposition des cellules à l'arsenite (154). Ces quelques résultats démontrent bien que les facteurs de transcription Yaps ont des fonctions chevauchantes mais aussi bien distinctes. Il devient donc important d'approfondir les mécanismes de régulation des gènes par les facteurs Yaps afin de mieux cerner leurs rôles dans la cellule.

#### 1.4.2 *Yap1p*

Yap1p est le facteur le plus étudié. Chez *S. cerevisiae*, Yap1p est une protéine essentielle à la résistance au stress oxydatif et confère également la résistance pléiotropique aux drogues. Sa surexpression est associée à la résistance des cellules à une grande variété de composés toxiques comme le cycloheximide, le 4-nitroquinoline-n-oxyde (4-NQO), le méthyl de sulfométuron, le fluconazole et le cadmium ainsi qu'à la tolérance au stress oxydatif induit par différents composés tels le peroxyde d'hydrogène et le diamide (fig. 1, (52;58;73;122;129;140;142;152)).

### 1.4.2.1 La réponse au stress oxydatif

Le rôle de Yap1p dans la réponse au stress oxydatif a été démontré par l'identification de ses cibles transcriptionnelles. En effet, Yap1p régule entre autres l'expression d'enzymes impliquées dans la voie du glutathion tels la réductase de glutathion Glr1p, la synthétase de glutathion Gsh1p et la thiorédoxine Trx2p (43;73;153). Il a plus tard été découvert que la régulation de *GSH1* dépendait également du facteur de transcription Met4p. Les résultats fournis par cette étude ont indiqué que l'activation dépendante de Yap1p de l'expression de *GSH1* en réponse à une déplétion de glutathion était régulée par l'état de réduction du soufre dans la cellule à travers un mécanisme spécifique dépendant de Met4p (145). De plus, *GSH1* semble impliqué dans la réponse cellulaire déclenchée par l'exposition des cellules au mercure et ce, via Yap1p (144). L'expression de *GSH1* et *GSH2* est induite par un stress de choc thermique et ce, d'une manière dépendante de Yap1p. Ce résultat suggère que le stress provoqué par un choc thermique augmente l'utilisation de l'oxygène, résultant en une augmentation des ÉOR dans les mitochondries (130). Par ailleurs, le séquençage du génome de *S. cerevisiae* a permis la mise au point d'expériences à grande échelle sur l'ensemble du génome. Ainsi, les puces d'ADN ont permis d'établir une liste de gènes répondant à la surexpression de *YAP1* et pouvant être considérés comme des effecteurs potentiels. Parmi les gènes découverts, on retrouve des gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif telles que les déshydrogénases d'aryl-alcool (*AAD6* et *AAD10*), les oxydoréductases de NAD(P)H (*OYE2* et *OYE3*) et la transférase de glutathion (*GTT2*) (30).

La délétion de *YAP1* mène à l'hypersensibilité à une grande variété d'agents oxydants comme le cadmium, le  $H_2O_2$  et le diamide. De la même manière, la délétion de *MSN2* et *MSN4* provoque l'hypersensibilité au  $H_2O_2$  mais ces cellules demeurent toujours capables de s'adapter à ce stress. Cela suppose que Msn2p/Msn4p et Yap1p agissent par deux voies indépendantes et distinctes dans la réponse au stress causée par le  $H_2O_2$  (50). Aussi, l'expression du gène hypoxique *SRP1/TIR1* dépend en grande partie de l'absence d'hème et est indépendante de la répression par Rox1p, sous-entendant qu'une deuxième voie de la réponse hypoxique existe (12). L'implication d'une nouvelle voie antagoniste incluant le répresseur Ixr1p/Ord1p et Yap1p a été démontrée. En effet, Ord1p réprime l'expression de *SRP1* en condition normale ou hypoxique

alors que Yap1p l'active. Par contre, Yap1p n'est pas directement impliquée dans l'induction de *SRP1* en condition hypoxique mais est nécessaire pour contrecarrer l'effet de Ord1p (12).

#### 1.4.2.2 La résistance pléiotropique aux drogues

Chez la levure, deux réseaux de gènes, PDR (*Pleiotropic Drug Resistance*) et YAPs, sont responsables de la résistance pléiotropique aux drogues. Les déterminants majeurs du réseau PDR sont les facteurs de transcription Pdr1p et Pdr3p. Ces facteurs contiennent un motif de liaison à l'ADN  $Zn_2Cys_6$  dans la région N-terminale, la portion centrale contient quelques motifs pouvant être des domaines d'inhibition alors que la zone C-terminale est constituée d'un domaine d'activation riche en résidus acides (7). Pdr1p et Pdr3p lient la même séquence consensus nommée PDRE («*Pdr1p/Pdr3p Response Element*») présente en nombres et en combinaisons différentes. Ces séquences sont principalement TCCGCGGA, TCCGtGGA et TCCaCGGA où les acides nucléiques en minuscule ont un rôle mineur dans la reconnaissance du site PDRE.

La délétion de *PDR1* provoque un effet plus prononcé sur la sensibilité aux composés toxiques que la délétion de *PDR3*. Cependant, la sensibilité à un groupe de composés toxiques tels la rhodamine et la diazaborine, est plus affectée par l'inactivation de *PDR3*. Cela suggère que Pdr1p et Pdr3p reconnaissent et activent différents sous-ensembles de gènes. En effet, les gènes cibles de Pdr1p/Pdr3p sont entre autres les transporteurs de la famille ABC Pdr5p, Snq2p et Yor1p et les transporteurs de la famille des facilitateurs Hxt9p et Hxt11p. Pdr1p est également en mesure de réguler l'expression de *PDR3*, d'*IPT1*, dont le produit joue une fonction dans la biosynthèse de sphingolipides, et de *PDR16* codant pour une protéine affectant la composition en phospholipides et en stérol de la membrane plasmatisque. De son côté, Pdr3p est capable de contrôler sa propre expression via une boucle autorégulatrice (71).

Le réseau YAP participe également à la résistance pléiotropique aux drogues où la protéine Yap1p chez *S. cerevisiae* et ses homologues chez les autres levures participent le plus activement à cette résistance. En présence de conditions stressantes, Yap1p contribue directement à l'activation transcriptionnelle d'un groupe de protéines et module indirectement l'activité des STRE, éléments clés de la réponse au stress général. Yap1p régule entre autre

l'expression de *YCF1*. Ce gène code pour une pompe de détoxification qui contrôle le transport vacuolaire et dépendant de l'ATP du glutathion conjugué (84;114). *Ycf1p* est également un gène essentiel dans la résistance des cellules au cadmium (141). D'autres cibles, comme *FLR1* et *ATR1*, sont impliquées dans les phénotypes de résistance dépendants de *Yap1p*. Ces gènes codent pour des transporteurs de type facilitateur responsables de la résistance au fluconazole, au cycloheximide, au 4-NQO, au 3-aminotriazole et au 1,10-phénantroline, respectivement (1;70). De plus, *Yap1p* semble participer à l'activation de certains gènes faisant partie de la famille PDR, suggérant ainsi une interaction entre les réseaux YAP et PDR. De fait, le promoteur des gènes *PDR5* et *SNQ2* possèdent, en plus du PDRE, un «Yap Response Element» (YRE, TTACTAA) (35). Plus tard, d'autres sites de liaison pour *Yap1p* ont été démontrés. Il s'agit de TTAGTCA et TGAATA (103). La présence du gène *YAP1* fonctionnel est requise pour l'expression de *SNQ2* stimulée par une condition de stress (149). Il semble donc que *Yap1p* puisse contribuer au contrôle de la résistance au 4-NQO et au cycloheximide via les gènes codant pour les transporteurs ABC *PDR5* et *SNQ2* et pour le transporteur facilitateur *Flr1p*.

La résistance à la diazaborine et au 4-NQO est principalement dépendante du gène *PDR3* (143). De plus, le mutant *pdr3Δ* est hypersensible à la diazaborine lorsque *YAP1* est surexprimé, démontrant que la résistance à la diazaborine conférée par la surexpression de *Yap1p* s'exerce via *PDR3* (143). La résistance au fongicide bénomyle implique l'activation drastique de *FLR1*. Il a été démontré que cette activation est complètement abolie dans une souche *yap1Δ* alors que la délétion de *PDR3* provoque une diminution partielle de l'expression de *FLR1* (131). Ces résultats, jumelés à l'observation que *Yap1p* affecte indirectement la résistance à la diazaborine, suggèrent l'existence d'une activation de *Pdr3p* dépendante de *Yap1p* plutôt qu'une liaison directe de *Yap1p* aux gènes responsables de cette résistance (71). Finalement, la résistance au cadmium conférée par *Yap1p* semble impliquer la thiorédoxine et la réductase de la thiorédoxine puisque les souches délétées des gènes codant pour ces protéines sont hypersensibles à ce métal. Ce résultat suggère que les deux systèmes de réduction du thiol, soient le glutathion et la thiorédoxine, sont essentiels pour le processus de défense contre le cadmium (136).



### 1.4.2.3 La régulation de la localisation sous-cellulaire de Yap1p

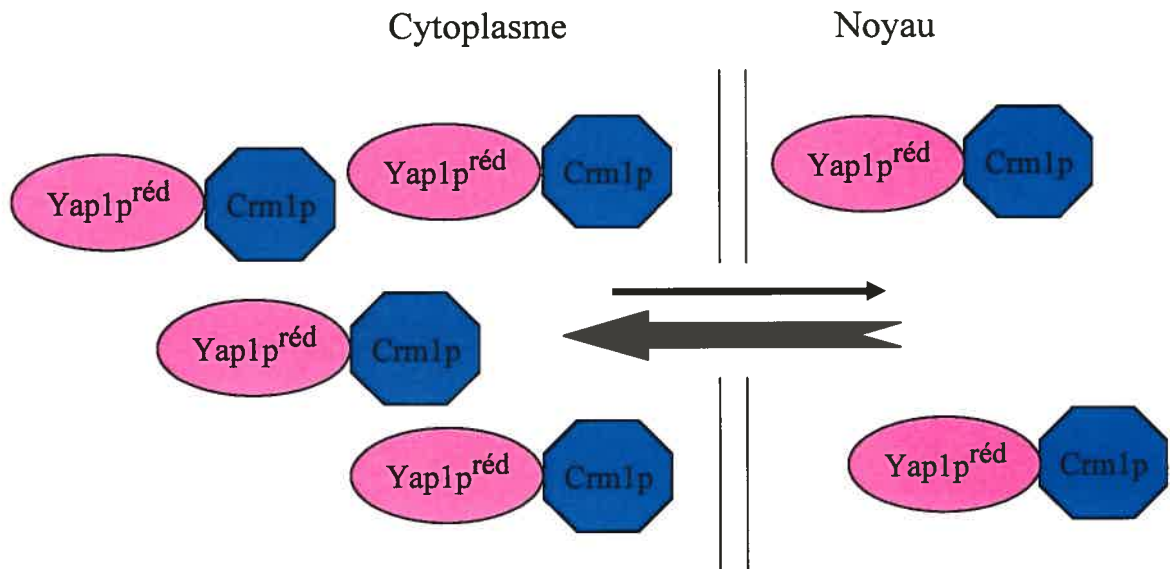
La régulation de la localisation cellulaire de Yap1p est bien décrite. En effet, il est connu qu'en condition non stressante, Yap1p fait la navette entre le cytoplasme et le noyau. Psf1p, un membre de la famille des importines  $\beta$ , contrôle l'import de Yap1p dans le noyau alors que l'exportine Crm1p exporte Yap1p du noyau au cytoplasme (fig. 2A, (61:75)). Psf1p reconnaît la séquence de localisation nucléaire (SLN) située dans la partie N-terminale de Yap1p tandis que Crm1p lie la séquence d'export nucléaire (SEN) localisée à l'extrémité C-terminale (fig. 3). Il a également été établi que deux autres éléments de la protéine sont importants pour sa localisation cellulaire. Il s'agit de domaines appelés CRD, pour domaine riche en cystéines, situés en N- et C-terminal. D'ailleurs, la SEN est située dans le C-CRD. Si l'import de Yap1p n'est pas influencé par le stress oxydatif, son export est grandement perturbé (61). En présence de conditions stressantes, l'oxydation des cystéines des CRD entraîne la formation de liens disulphides intramoléculaires qui inhibent l'export nucléaire dépendant de Crm1p en bloquant l'accessibilité de Crm1p à la SEN de Yap1p. Les cystéines servent donc de senseurs du niveau d'oxydation de Yap1p (25). Cette dernière demeure donc séquestrée au noyau et s'accumule, permettant l'activation de ses cibles transcriptionnelles (fig. 2B). Il a également été démontré que Yap1p pouvait s'accumuler au noyau en réponse à la privation d'une source de carbone, suggérant un nouveau rôle pour Yap1p dans le métabolisme du carbone (146).

En plus, la présence de diamide ou de peroxyde d'hydrogène n'entraîne pas l'oxydation des mêmes cystéines de Yap1p, ayant pour conséquence l'activation de différentes cibles (134). En effet, l'activation de Yap1p par le  $H_2O_2$  implique la formation d'un lien disulphide entre les cystéines 303 et 598 suite à leur oxydation alors que les cystéines 598, 620 et 629 servent à la fois de senseurs et de régulateurs lorsque oxydées et liées par leur soufre après un traitement au diamide (5). Ces deux centres de réduction bloquent la liaison de Crm1p à Yap1p mais par un mécanisme différent. D'ailleurs, il est maintenant connu que l'accumulation nucléaire de Yap1p due à la présence de  $H_2O_2$  est dépendante de la peroxidase de thiol Gpx3p. Cette dernière sert de senseur de  $H_2O_2$  et forme un lien disulfide avec la cystéine 598 de Yap1p. Ce lien intermoléculaire est par la suite transformé en un lien intramoléculaire entre les cystéines 598 et

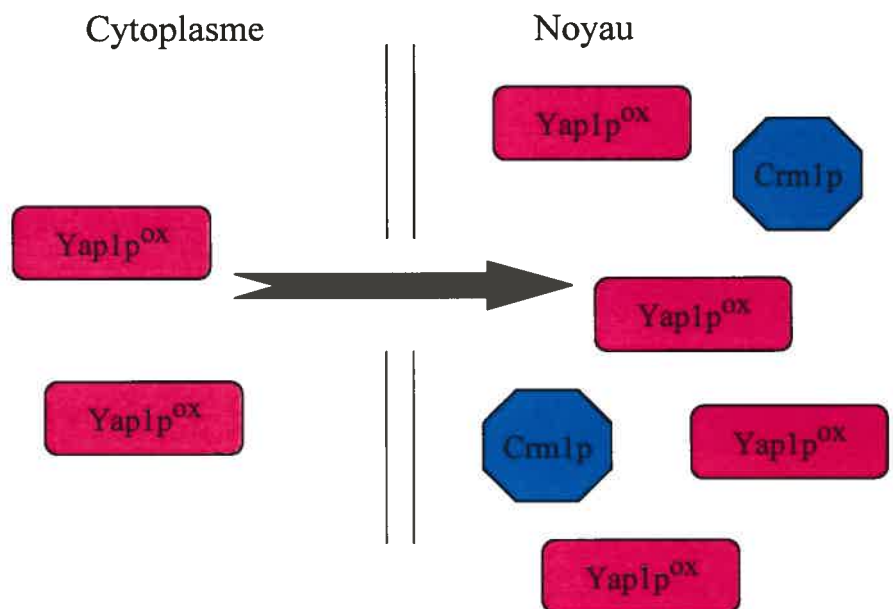
**Fig. 2 Régulation de la localisation sous-cellulaire de Yap1p.**

A) En absence de stress oxydatif, Yap1p sous forme réduite voyage entre le cytoplasme et le noyau à l'aide de l'importine Pse1p et de l'exportine Crm1p. Yap1p est majoritairement localisée au cytoplasme due à un export plus efficace. B) En présence de stress oxydatif, certaines cystéines de Yap1p deviennent oxydées, entraînant un changement de conformation protéique. Ce dernier empêche la liaison de Yap1p à Crm1p puisque sa séquence d'export nucléaire devient inaccessible, causant ainsi une accumulation de Yap1p oxydée au noyau (133). Yap1p<sup>red</sup>:Yap1p dont les cystéines sont sous forme réduite, Yap1p<sup>ox</sup>:Yap1p dont les cystéines sont sous forme oxydée. Afin de simplifier le schéma, Pse1p n'est pas montrée.

## A) Absence de stress oxydatif



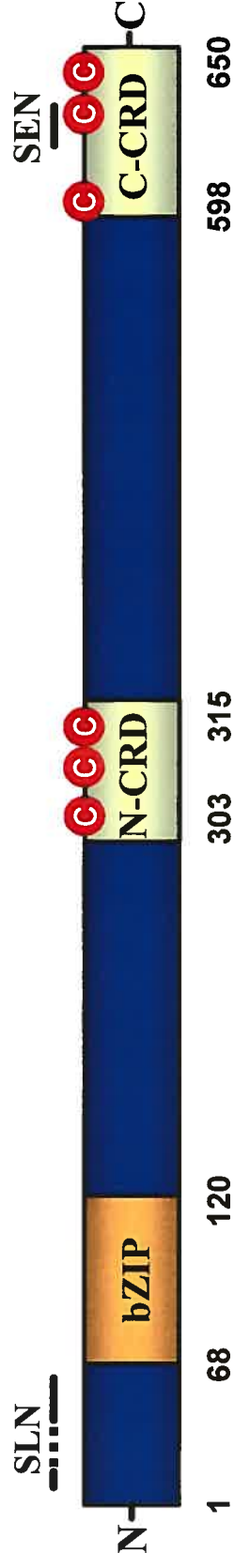
## B) Présence de stress oxydatif



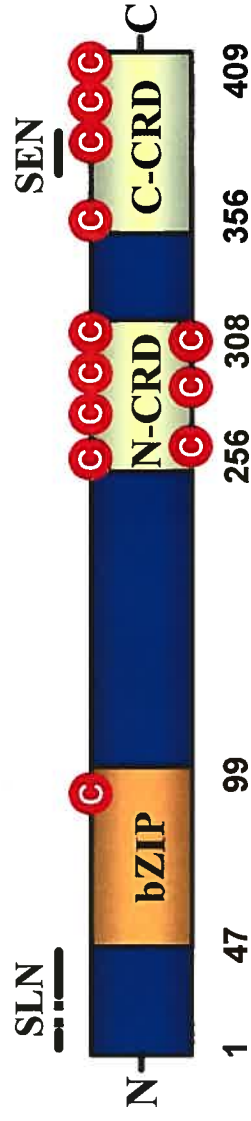
**Fig. 3 Structure protéique prédite de Yap1p et Yap2p.**

Schématisation des protéines Yap1p et Yap2p montrant les domaines bZIP, riches en cystéines situés en N-terminal (N-CRD) et C-terminal (C-CRD) ainsi que les séquences de localisation nucléaire (SLN) et d'export nucléaire (SEN).

Yap1p



Yap2p

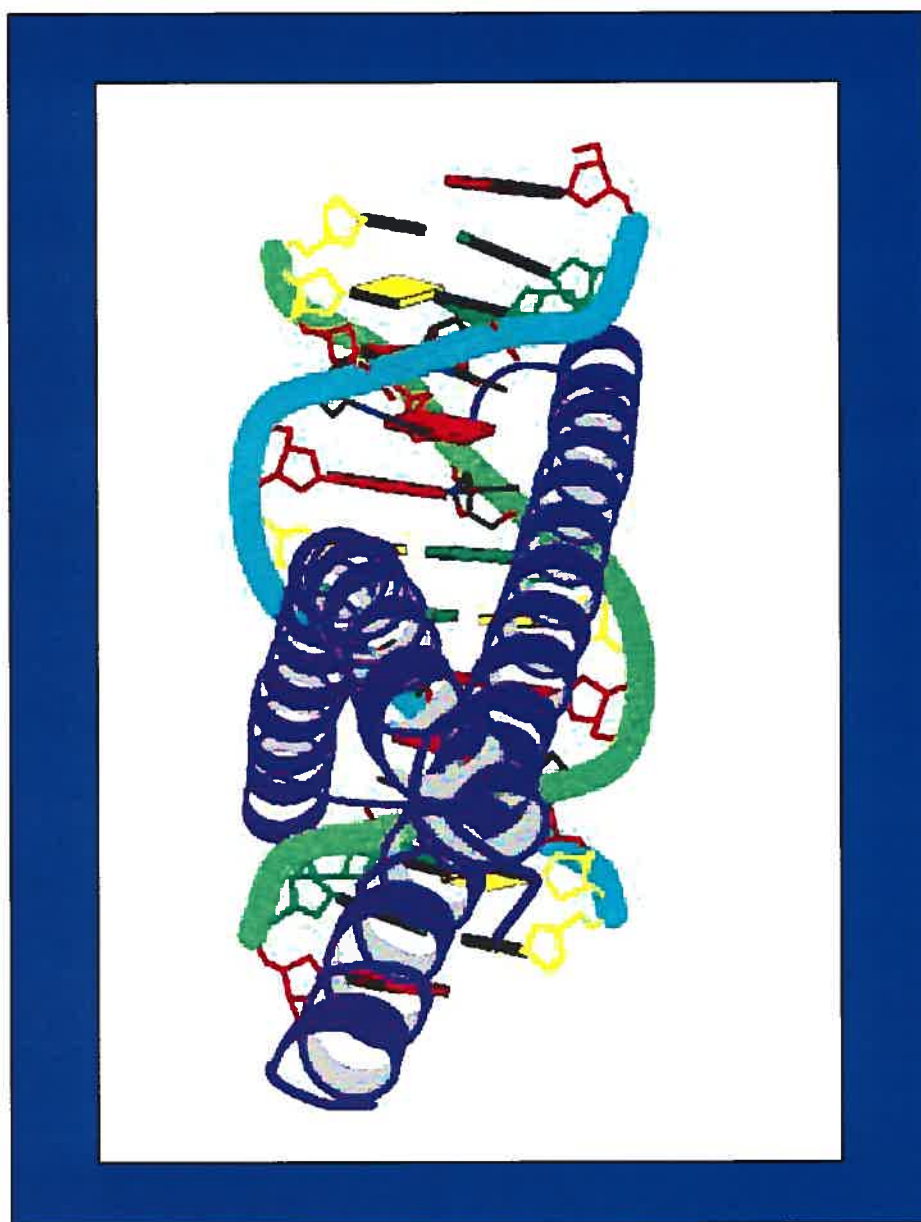


303 de Yap1p (27). Une autre analyse a également noté l'importance d'une autre protéine dans l'accumulation nucléaire de Yap1p en réponse au  $H_2O_2$ , soit Ybp1p. Cette protéine agit dans la même voie que Gpx3p (134). Récemment, il a été démontré que Yap1p est activée par un stress produit par la présence d'arsénite et est, par le fait même, impliquée dans la tolérance à l'arsénite, tout comme Yap8p. Par contre, ces deux facteurs réagissent à l'arsénite via différents mécanismes (155). Cette étude a démontré qu'un mutant de Yap1p incapable de s'accumuler dans le noyau en réponse à un traitement au  $H_2O_2$  montrait une rétention nucléaire normale suite à une exposition au métalloïde. Ce résultat montrait pour la première fois que Yap1p était régulée par un stress produit par les métalloïdes et que l'activation de la protéine opérait de manière différente de celle observée lors d'une exposition à des agents oxydants (155).

#### 1.4.2.4 Les homologues de Yap1p chez les autres levures

Parmi les huit protéines Yap, Yap1p est le membre le plus conservé chez les levures. On retrouve un homologue chez *S. pombe*, Pap1p, chez *C. albicans*, Cap1p, et chez *Kluyveromyces lactis*, Kap1p (132). Pap1p a été initialement isolée pour son rôle dans la résistance à l'inhibiteur de protéine kinase staurosporine. Yap1p et Pap1p semblent régulées de manière similaire. Cependant, il n'est pas encore clair que Pap1p soit le senseur direct du stress oxydatif (72). Un article a montré la structure tri-dimensionnelle de Pap1p (fig. 4 et (37)). Cette protéine lie l'ADN en dimère et son domaine bZip agrippe l'ADN comme une paire de baguette. Le gène *CAP1* a originellement été isolé pour sa capacité, lorsque cloné dans un vecteur multicopiess, à conférer la résistance à l'antifongique fluconazole chez *S. cerevisiae* (1). Cap1p semble régulée de la même manière que Yap1p et est impliquée dans la tolérance au diamide et au  $H_2O_2$  (1). Il apparaît également que Cap1p chez *C. albicans* régule les homologues des cibles de Yap1p chez *S. cerevisiae*, particulièrement le transporteur de la famille des facilitateurs Flr1p et la peroxydase de glutathion Glr1p (95). Finalement, la découverte du gène *KAP1* a été réalisée grâce à son aptitude à compléter l'hypersensibilité aux oxydants observée chez une souche de *S. cerevisiae* *yap1Δyap2Δ*. La délétion de *KAP1* dans *K. lactis* montre que ce gène est important dans la réponse au stress oxydatif entraîné par l'exposition des cellules au  $H_2O_2$  et au cadmium. Il a également été démontré que ce gène induit une réponse de protection au stress due à la présence de superoxydes (9).

**Fig. 4 Structure tri-dimensionnelle de la liaison de Pap1p à l'ADN.** Structure globale de la liaison d'un dimère du domaine bZIP (en mauve) de Pap1p à l'ADN. Tout comme Gcn4p et Fos-Jun, un dimère de Pap1p saisit l'ADN dans son sillon majeur comme une paire de baguette (37).





### 1.4.3 *Yap2p*

Si l'on connaît beaucoup de choses sur Yap1p, très peu sont connues sur son plus proche homologue, Yap2p. La surexpression du gène *YAP2* a permis de faire sa découverte puisque celle-ci confère la résistance au cadmium. Conséquemment, il avait été nommé *CAD1* (151). Une recherche bioinformatique des protéines contenant un domaine bZIP chez *S. cerevisiae* a montré que *CAD1* appartenait à une sous-famille de huit protéines apparentées aux facteurs AP-1 de mammifères (35). Plus tard, *CAD1* fut renommé *YAP2* par Bossier *et al.* (11). Quant à sa structure protéique, un modèle a été créé en comparant sa séquence protéique à celle de Yap1p (fig. 4). Yap1p et Yap2p possèdent 88% d'identité dans leur région de liaison à l'ADN et montrent aussi une similarité au niveau de leur motif en fermeture éclair de leucines (35). Yap2p est une protéine de 409 acides aminés et possède beaucoup plus de cystéines dans son N- et C-CRD que Yap1p (53). Contrairement à Yap1p, Yap2p est incapable de lier la séquence consensus des facteurs de transcription AP-1 TGACTCA mais reconnaît le YRE TTACTAA (35). Les phénotypes observés suite à la délétion ou à la surexpression de Yap2p sont beaucoup moins nombreux que ceux causés par la présence ou l'absence de Yap1p. En fait, il est connu que la délétion de *YAP2* cause l'hypersensibilité au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, au ménadione et au cadmium alors que sa surexpression amène l'apparition de la résistance au cadmium, au cycloheximide et au 1,10-phénantroline (11;53;129). Il a également été suggéré que Yap1p et Yap2p pouvaient influencer le métabolisme du fer. En effet, les cellules étaient plus résistantes au cadmium lorsqu'elles poussaient dans un milieu contenant un excès de fer. Le cadmium réduit la capture du fer de la cellule en croissance alors que l'activité ferriréductase en est également grandement réduite. Ces deux effets sont dépendants du dosage de *YAP1* et *YAP2* (80).

Par la suite, l'arrêt de croissance causé par une basse concentration de 1,10-phénantroline, qui cause une déplétion en zinc et/ou fer, est surmonté par la surexpression de *YAP1* ou *YAP2*. D'un autre côté, la souche *yap2Δ* montre une augmentation de la thermotolérance en condition de déplétion causée par le 1,10-phénantroline (11). Plusieurs articles ont également souligné que Yap1p et Yap2p pouvaient compléter le phénotype établi par la délétion d'un des deux facteurs. Par exemple, la surexpression de *YAP2* peut enrayer l'hypersensibilité au cadmium engendrée par la délétion de *YAP1* (53). Dans un même ordre d'idées, l'induction rapide de l'expression des deux

gènes codant pour les transporteurs ABC Pdr5p et Snq2p après un traitement à la chaleur était la même dans les simples mutants *yap1Δ* ou *yap2Δ* comparativement à la souche sauvage alors que cette induction est presque complètement abolie dans le double mutant *yap1Δyap2Δ* (90). À l'opposé de Yap1p, aucune cible transcriptionnelle de Yap2p n'est encore connue. Cependant, une étude par biopuces a été réalisée à l'aide de souches sauvages, *yap1Δ* et *yap2Δ* traitées au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (23). D'après ces analyses, la majorité des gènes régulés par Yap1p auraient une fonction dans la détoxification de la cellule alors que ceux régulés par Yap2p seraient importants pour le repliement des protéines et leur stabilité telles des chaperones et des enzymes conjuguées à l'ubiquitine. Ces résultats seront commentés à la section discussion 4.1.1.4.

#### 1.4.4 La régulation de YAP1 et YAP2

Comme Yap1p et Yap2p ont un rôle majeur dans la réponse au stress oxydatif, des études ont voulu mettre en lumière le mode de régulation de ces deux facteurs. Premièrement, elles ont montré que le promoteur *YAP1* contenait un cadre de lecture ouvert (CLO) en amont (CLOa) du CLO principal alors que le promoteur *YAP2* en contenait deux. Il est maintenant connu que le CLOa de *YAP1* permet au ribosome 40S d'effectuer le «*leaky scanning*» et d'aller ré-initier la transcription au CLO principal. Par contre, les deux CLOas de *YAP2* bloquent le parcours du ribosome en promouvant la terminaison. De plus, ils fonctionnent comme des éléments *cis* en accélérant la dégradation des ARNm. Ces deux mécanismes de régulation de l'expression de *YAP2* définissent un nouveau type de système déstabilisant l'ARNm. Le parcours du ribosome et la dégradation de l'ARNm sont influencés tous les deux par la séquence codante et le contexte de l'ARNm, incluant les éléments en amont. Tout cela montre que la terminaison de la transcription d'un CLOa mature et non aberrant peut mener à la déstabilisation des ARNm. Celle-ci peut se faire via des voies différentes de celles utilisées normalement par la cellule pour se débarrasser des ARNm non matures contenant des codons stop. En effet, un contexte G/C riche reproduisant un codon stop dans les CLOas de *YAP2* semble promouvoir le relarguage des ribosomes et permettre aux CLOas d'agir en tant qu'élément de déstabilisation transférable de la région non-codante 5'. Bien que la déstabilisation amène l'arrêt de la transcription par les ribosomes dans la région 5' non-transcrite, celle-ci peut parfois favoriser la ré-initiation de la transcription. Ce mécanisme de contrôle de la

dégradation de l'ARNm non aberrant influence la réponse au stress (137;138). Ceci suggère que la nature des CLOas pourrait, en partie, déterminer la fonction des gènes en déterminant la vitesse de transcription et la durée de vie des ARNm (137). De fait, la transcription de *YAP2* semble plus complexe que celle de *YAP1*, ce qui pourrait expliquer en partie le fait que Yap1p s'avère un activateur plus fort, puisque plus facilement transcrit.

En plus, il a été prouvé que le CLOa de *YAP1* contenait un élément de stabilisation qui empêche la dégradation de l'ARNm. Ceci se fait par la voie de signalisation de la dégradation de l'ARNm non-sens qui interagit avec la protéine Pub1p. Cet élément de stabilisation est également présent chez le CLOa de *GCN4* (117). En plus, il a été démontré que l'ARNm de Yap1p contenait une séquence chef qui augmente l'initiation de la traduction. Cette séquence fonctionne comme un site d'entrée interne pour les ribosomes et est fréquemment observée chez les eucaryotes supérieures (161). Toutes ces différences au niveau de la transcription de *YAP1* et *YAP2* pourraient expliquer le contraste relevé au niveau des phénotypes d'hypersensibilité et de résistance. Il est aussi important de noter que l'activité de Yap2p est sûrement régulée au niveau post-traductionnelle puisque l'on sait que l'oxydation des cystéines de Yap1p et Yap8p est essentielle à leur activité (74;155).

## 1.5 Objectifs du projet

En somme, la relation fonctionnelle entre Yap1p et Yap2p est peu comprise. Ces deux facteurs ont des fonctions redondantes mais aussi bien distinctes. En plus, les phénotypes de sensibilité observés chez les souches *yap1Δyap2Δ* ne corrélaient pas directement avec les phénotypes observés chez les souches surexprimant les gènes *YAP1* et *YAP2*, suggérant que d'autres protéines Yaps pourraient avoir des fonctions redondantes avec celles de Yap1p et/ou de Yap2p. Il s'avère donc nécessaire de mieux caractériser les fonctions de Yap2p dans la cellule afin de clarifier son importance.

L'objectif général de mon projet de maîtrise était de mieux comprendre les fonctions de Yap2p, tout particulièrement celle impliquée dans la réponse au stress oxydatif. Mes objectifs spécifiques étaient :

- ❖ Identifier les cibles transcriptionnelles de Yap2p afin de prédire ses rôles dans la cellule
- ❖ Étudier l'influence de Yap2p dans l'induction de ses cibles, notamment dans la réponse au stress oxydatif
- ❖ Examiner l'implication des cibles de Yap2p dans la résistance au stress oxydatif conférée par la surexpression de *YAP2*
- ❖ Documenter les mécanismes par lesquels Yap2p régule l'expression de ses cibles.

## **CHAPITRE 2 : MÉTHODOLOGIE**

### **2.1 Souches de levures et conditions de croissance utilisées**

Les souches utilisées dans ce mémoire sont listées à la Table 1. Les cellules ont été cultivées dans du milieu complet (YPD, pour «yeast peptone dextrose») ou sélectif (SD, pour «synthetic dextrose») sans uracile (SD-ura), sans leucine (SD-leu) ou sans uracile et sans leucine (SD-ura-leu) (123). Les levures ont été transformées par la méthode de l'acétate de lithium (62). La croissance des levures a été effectuée à 30°C.

Table 1. Souches de *S. cerevisiae* utilisées dans cette étude.

Nom	Génotype	Source
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Research Genetics
569	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 yap1Δ::KanX</i>	Research Genetics
3143	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 flr1Δ::KanX</i>	Research Genetics
4069	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ycf1Δ::KanX</i>	Research Genetics
4259	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 yap2Δ::KanX</i>	Research Genetics
7178	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 frm2Δ::KanX</i>	Research Genetics
YAP2-MYC #2, 4	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YAP2-MYC -URA-MYC</i>	Cette étude
YAP2-MYC # 4- 1, 4-2	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YAP2-MYC</i>	Cette étude

### **2.2 Préparations des sondes et constructions de plasmides**

#### *2.2.1 Préparations des sondes*

Les oligonucléotides utilisés pour la synthèse des sondes sont présentés dans la Table 2. Les sondes utilisées pour cette étude ont été amplifiées par «polymerisation chain reaction» (PCR) à l'aide de l'ADN polymérase *Taq* (Stratagene) en utilisant l'ADN génomique de la souche BY4741 comme gabarit. Les fragments obtenus ont été extraits d'un gel d'agarose et purifiés par le «QIAquick PCR Purification Kit» (Qiagen). Leur longueur a été vérifiée à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire.

### 2.2.2 Constructions des plasmides

Les oligonucléotides utilisés pour la construction des plasmides sont montrés à la Table 2. Un fragment d'ADN de 1243 paires de bases (pb), comprenant l'intégralité du CLO de *YAP2*, a été amplifié par PCR utilisant l'ADN génomique de la souche BY4741 et l'ADN polymérase *Pfu* (Stratagene). Les oligonucléotides employés introduisaient un site de restriction *SpeI* (séquences soulignées, Table 2). Le fragment obtenu a été purifié sur gel à l'aide du «QIAquick PCR Purification Kit» et cloné dans le site *SpeI* des vecteurs muticopie p425GPD (*LEU2*), p426GPD (*URA3*) et p426ADH (*URA3*) (Qiagen) (98). Le CLO de *YAP1* a été cloné de manière similaire et intégré au site *SpeI* du vecteur p426ADH. Le séquençage de l'ADN du vecteur p426GPD-*YAP2* a permis de confirmer que l'insert cloné était bien le gène *YAP2*. Les vecteurs p425GPD-*YAP2* et p426ADH-*YAP2* ont été digérés par l'enzyme *EcoRI* alors que le vecteur p426ADH-*YAP1* a été digéré par l'enzyme *KpnI* afin de vérifier que l'insert cloné était le bon gène et que celui-ci était dans la bonne orientation.

Les délétions séquentielles du promoteur *FRM2* ont été réalisées par amplification par PCR d'un fragment d'ADN correspondant à une région du promoteur et du codon d'initiation de la transcription ATG. Les oligonucléotides utilisés introduisaient un site de restriction *XhoI* en amont (oligonucléotide sens) et un site *BamHI* en aval (oligonucléotide anti-sens) (séquences soulignées, Table 2). Les fragments obtenus ont été générés par l'ADN polymérase *Pfu* et amplifiés à partir de l'ADN génomique de la souche BY4741. Les produits de PCR ont été purifiés sur gel à l'aide du «QIAquick PCR Purification Kit» et clonés dans le vecteur centromérique ARS-CEN/*LacZ* (généreusement fourni par le Dr Bernard Turcotte, Université McGill, Montréal, Canada) coupé *XhoI/BamHI* (105). Ces constructions nous permettent d'obtenir des délétions séquentielles du promoteur *FRM2* en fusion avec le gène rapporteur *LacZ*. Elles ont été nommées en fonction de la position en 5' de la section du promoteur qui a été clonée où le A du codon d'initiation de la transcription correspond à +1. Le séquençage de l'ADN du plasmide -853 *FRM2P* a permis de certifier que l'insert était cloné dans le bon cadre de lecture. Pour la construction des mutants, la mutagenèse dirigée a été effectuée tel que décrit dans le protocole «Quickchange site-directed mutagenesis kit» (Qiagen). L'ADN du plasmide -301

**Table 2. Oligonucléotides utilisés pour la synthèse des sondes et la construction des plasmides.** a : les positions sont relatives au codon d'initiation de la transcription. b : les conditions de PCR sont : 1' à 94°C, 1' à la température d'hybridation (T<sub>m</sub>) indiquée, au temps (T) indiqué à 72°C, répétées 30 fois et conservées à 4°C, c : s :oligonucléotide sens, d : as :oligonucléotide anti-sens, e : les séquences soulignées représentent divers sites de restriction, f : seq :oligonucléotide utilisé pour le séquençage, g : les séquences en caractères gras indiquent des mutations (voir la section 2.2.2). ' : minute, " : seconde.

Gène	Nom	Séquences (5'-3')	Positions dans le CLO <sup>a</sup>	Conditions de PCR <sup>b</sup>
Sondes				
<i>AAD4</i>	MR612	s <sup>c</sup> ATGGGCTCTATGAATAAGGAACAG	-8 à +12	T <sub>m</sub> :54°C
	MR613	as <sup>d</sup> ACTTTTACCGCCACCTACTTCATAC	+1011 à +993	T:35"
<i>ACT1</i>	ACT1-1	S TTGAAACACGGTATTGTCCAC	+520 à 538	T <sub>m</sub> :50°C
	ACT1-2	as AATTCCCTTACGGACATCGAC	+1187 à +1167	T:4'15"
<i>ARN4</i>	MR901	s AGGGCAGATTTCGCAATCAA	+230 à +249	T <sub>m</sub> :50°C
	MR902	as AGCCACGCAAGAAAAAACAG	+1739 à +1720	T:2'
<i>ARR2</i>	MR596	s CAATCCAGCAAGCGTAATG	-16 à +3	T <sub>m</sub> :58°C
	MR597	as GCTTGAGGAGCTCAACCAC	+404 à +386	T:1'
<i>ARR3</i>	MR910	s CCCAACCACAAATCATCAGG	-32 à -13	T <sub>m</sub> :50°C
	MR911	as GGTGCCCAAGTAATTTTITGG	+1247 à +1228	T:1'40"
<i>FIT3</i>	MR903	s TTTTGTTTGGGGTGGTGAAG	+129 à +148	T <sub>m</sub> :50°C
	MR904	as TTGCAGTGGTTGAAGCAGAA	+478 à 459	T:35"
<i>FLR1</i>	MR165	s GCTCTAGAAATGGTATACACTTCAACG	+1 à +18	T <sub>m</sub> :50°C
	MR166	as GGCTTTCTACTCCTCTGTGTACGA	+1653 à +1620	T:4'15"



<i>FRE1</i>	MR905	s	AGCATCCCAATGTTCAAGCA	+247 à +256	Tm:50°C
	MR906	as	GAGTTTTTATTTCCGAGCGCA	+1917 à +1848	T:2'
<i>FRM2</i>	MR594	s	CCTCCAAGCCAAAG AATG	-16 à +3	Tm:58°C
	MR595	as	GCGAATTTCTCTGTTTCAGTGA	+595 à +576	T:1'
<i>GPX2</i>	MR604	s	GCAACAAAAAGTAATAATTCAAAATG	-23 à +3	Tm:57°C
	MR605	as	GCTTGATTATAGACAAAAGATATCATTTAC	+510 à +482	T:50"
<i>OLE1</i>	MR645	s	ACAAAAGATGCCAACTTCTGG	-6 à +14	Tm:50°C
	MR646	as	CTCTTACTAGCCATTCTAATAGCAG	+1574 à +1599	T:4'
<i>OYE3</i>	MR616	s	GCGAAAGTTTAAATTTAGAAGATGC	-20 à +4	Tm:51°C
	MR617	as	CATGATTTTCAGTTCTTGTGTTCCA	+1210 à +1188	T:1'50"
<i>YAP1</i>	MR618	s	GGACTAGTTGTTTCTTAAACCATGAGT <sup>c</sup>	-13 à +6	Tm:57°C
	MR619	as	GGACTAGTTTAGTTTCATATGCTTATTCAAAAG	+2531 à +2552	T:4'20"
<i>YAP2</i>	MR431	s	GGACTAGTCCAGTTAAGATAAATGGGC	-13 à +6	Tm:55°C
	MR432	as	GGACTAGTCTACAGGAGCTGTCTAACC	+1230 à +1212	T:1'35"
<b>Plasmides d'expression</b>					
<i>YAP1</i>	MR618	s	GGACTAGTTGTTTCTTAAACCATGAGT	-13 à +6	Tm:57°C
	MR619	as	GGACTAGTTTAGTTTCATATGCTTATTCAAAAG	+2531 à +2552	T:50"
<i>YAP2</i>	MR431	s	GGACTAGTCCAGTTAAGATAAATGGGC	-13 à +6	Tm:55°C

MR432	as	GGACTAGTCTACAGGAGCTGTCTAACC	+1230 à +1212	T:1'35"
YAP2 (séq.) <sup>f</sup>	MR242	s	CGGTAGGTATTGATTGTAATTC	dans le GPD

# Promoteur *FRM2*

-853	MR706	s	ATCGACTCGAGCGACCTAGATTCTCATAGAC	-853 à -834	Tm:57°C, T:
-433	MR791	s	ATCGACTCGAGGAACGATCTTCTTGCCTT	-433 à -416	Tm:50°C, T:1'30"
-301	MR749	s	ATCGACTCGAGCAATGTCTGCGAGTGTAC	-301 à -283	Tm:60°C, T:45"
-258	MR805	s	ATCGACTCGAGATGCTCTTCCGAAATAAT	-258 à -241	Tm:50°C, T:50"
-215	MR792	s	ATCGACTCGAGCTTTTCCTTACTGCGACA	-215 à -197	Tm:50°C, T:45"
	MR707	as	CGG GAT CCC ATT TCT TTG GCT TGG AG	-15 à +3	-
Mut.1	MR817	s	GCGAGTGTTACTTGTCTAGAAATCAATAATTGTCA <sup>g</sup>	-301 à -267	Tm:55°C
Mut.1	MR818	as	TGACAAATATTGATTCTAGATCAAGTAACACTCGC	-301 à -267	T:18'
Mut.2	MR815	s	CAATGCTCTGCGAGTGTCTAGTGATTATTAATCAATA	-301 à -266	Tm:55°C
Mut.2	MR816	as	TATTGATTAAATAATCACTAGACACTCGCAGACATTG	-301 à -266	T:18'
(séq.)	MR707	s	ATCGACTCGAGTTGTCAAATGCTCTTCCGA	-279 à -262	-

*FRM2P* a été utilisé comme gabarit et amplifié par PCR à l'aide de l'ADN polymérase *Pfu* turbo. Les oligonucléotides employés ont inséré la mutation CTAG au lieu de TATT pour le YRE1 et TACT pour le YRE2 (caractère gras, Table 2). Ces mutations détruisent donc les sites de liaison potentiels de Yap2p. Le produit amplifié a par la suite été digéré par l'enzyme *DpnI*, éliminant ainsi le brin sauvage méthylé. Le séquençage de l'ADN de l'insert du mutant 1 a permis de confirmer la mutation et le bon cadre de lecture du promoteur *FRM2*.

### 2.3 Tests de résistance aux oxydants

Les tests de résistance aux oxydants ont été réalisés comme décrit précédemment (1). Brièvement, les cellules ont été cultivées toute la nuit dans le YPD ou le milieu SD-ura. Les cultures ont été diluées à une  $DO_{600}$  de 0.1 et rediluées de manière successives (1/5, 1/25, 1/125, 1/625). Des aliquots de 3  $\mu$ l de chaque dilution ont été déposés sur des pétris de YPD ou de SD-ura contenant ou non des oxydants et incubés 2 à 3 jours à 30°C. Les pétris ont été préparés le jour de l'utilisation. Les solutions stock ont préalablement été préparées et conservées à -80°C. La solution stock de diamide 1 M (Sigma) a été préparée dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO). La solution stock de sulfate de cadmium 50 mM (Laboratoire Mat) a été préparée dans de l'eau et la solution stock de 1,10-phénantroline 50 mM (Sigma) a été préparée dans l'éthanol 50%.

### 2.4 Analyse Northern

Les cellules ont été cultivées toute la nuit et ont ensuite été diluées à une  $DO_{600}$  de 0,2 dans 100 ml de milieu. Lorsqu'elles ont atteint une  $DO_{600}$  de 1,0, l'ARN total a été extrait par la méthode d'extraction aux billes de verre (151). 20  $\mu$ g d'ARN de chaque échantillon ont été chargés sur un gel 1% agarose 7,5% formaldéhyde et transférés sur une membrane Hybond-N (Amersham). La détection d'ARN spécifiques a été réalisée par une hybridation à 65°C avec  $7,5 \times 10^6$  cpm d'une sonde marquée au  $P^{32}$  (1).  $5 \times 10^5$  cpm d'une sonde *ACT1* ont été utilisés comme contrôle interne pour mesurer la quantité d'ARN et la qualité du transfert. En ce qui concerne les expériences d'induction, les cellules qui ont atteint une  $DO_{600}$  de 1,0 ont été traitées avec 0,2%

d'acide oléique (Sigma) pendant 6 heures ou 18 heures ou par 2.5 mM de diamide pendant 1 heure.

## 2.5 Puces d'ADN

### 2.5.1 Préparation des ARN

Le protocole utilisé pour l'expérience des biopuces est adapté de Lee *et al.* (78). Les souches *YAP2/p426GPD-YAP2* et *YAP2/p426GPD* ont premièrement été décongelées sur pétri et striées afin qu'elles poussent et forment des colonies isolées. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Trois colonies de chaque souche ont été cultivées toute la nuit dans 10 ml de milieu SD-ura et diluées à une  $DO_{600}$  de 0.1. Lorsque la  $DO_{600}$  a été située entre 0.5 et 1.0, les cellules ont été centrifugées pendant 4 minutes à 3500 rpm. Le surnageant a été enlevé et le culot a été resuspendu dans 6 ml d'eau stérile froide. Le culot resuspendu a été transféré dans un tube de 15 ml de polypropylène et centrifugé pendant 3-4 minutes à 2600 rpm. Le surnageant a de nouveau été enlevé et les tubes ont été congelés dans de l'azote liquide.

Le lendemain, les cellules ont été décongelées sur glace. Trois ml de phénol-chloroforme (5:1, préchauffé 10 minutes à 65°C, Sigma) et 3 ml de TES par 200 unités  $DO_{600}$  ont été additionnés. Les tubes ont par la suite été vortexés afin de resuspendre le culot et incubés pendant 1 heure à 65°C. À chaque 10 minutes d'incubation, les tubes ont été vortexés pendant 20 secondes. Suite à l'incubation, le contenu des tubes a été aliquoté dans des tubes de 1,5 ml et centrifugés à 14 000 rpm à 4°C pendant 20 minutes. 750 µl phénol-chloroforme (5:1) ont été additionnés aux aliquots. Ceux-ci ont été vortexés 20 secondes et centrifugés à 14 000 rpm à 4°C pendant 10 minutes. 750 µl de chloroforme-alcool isoamyle (25:1) ont été ajoutés aux ARN extraits. Ces derniers ont été vortexés 20 secondes et centrifugés à 14 000 rpm à 4°C pendant 10 minutes. La phase aqueuse a été transférée dans un tube contenant 50 µl d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et 1 ml d'éthanol 100%. Les tubes ont été conservés à -20 °C pendant au moins 30 minutes. L'ARN précipité a été centrifugé pendant 15 minutes à la température de la pièce et le surnageant a été enlevé. L'ARN a été lavé avec 500 µl d'éthanol 80% et centrifugé pendant 5

minutes. Le surnageant a été enlevé et l'éthanol résiduel a été laissé évaporer à l'air libre. Finalement, l'ARN a été resuspendu dans de l'eau-DEPC. L'évaluation de la qualité et la quantification des ARN ont été réalisées à l'aide du Bioanalyser 2100 utilisant les puces à ARN 6000 Nano (Agilent). L'ARN resuspendu a été dilué à une concentration de 10 µg/µl. Une quatrième extraction d'ARN des souches *YAP2/p426GPD-YAP2* et *YAP2/p426GPD* a été effectuée comme décrit afin de confirmer les résultats des biopuces par analyse Northern. L'ARN de la souche *yap2Δ/p426GPD* a également été extrait afin d'observer l'expression des gènes testés en absence de *YAP2*. 20 µg d'ARN ont été utilisés pour cette analyse.

### 2.5.2 Transcription inverse

Un mélange composé de 2 µl oligo-dT 3.0µg/µl, 2 µl «random primers» 2.5µg/µl (Invitrogen), 20 µg ARN et 20,2 µl d'eau-DEPC a été fait. Le tout a été incubé à 70°C pendant 10 minutes et refroidit sur glace pendant 2 minutes. Un autre mélange contenant 8 µl «first strand buffer» 5X, 4 µl DTT 0,1 M, 0,8 µl aa-dUTP/dNTPs 50 X (25 mM dA, dC, dGTP, 15 mM dTTP, 10 mM amino-allyl-dUTP), 1 µl RNase-OUT, 2 µl superscript II (Invitrogen) a été préparé. Ce mélange a été ajouté au mélange d'oligo dT/ARN et incubé à 42°C pendant au moins 3 heures. L'hydrolyse de l'ARN a été effectuée en ajoutant 10 µl de NaOH 1 M et 10 µl d'EDTA 0.5 M et le tout a été incubé à 70°C pendant 10 minutes. Après l'incubation, 10 µl de HCl 1 M ont été ajoutés afin de neutraliser la réaction et 30 µl d'eau-DEPC ont été additionnés afin d'obtenir un volume final de 100 µl.

### 2.5.3 Purification des ADNc

La purification de l'ADNc a été faite tel que décrit par le protocole «CyScribe GFX Purification Kit» (Amersham). Brièvement, 500 µl du tampon de capture ont été ajoutés à chaque colonne de purification. 100 µl d'ADNc ont été ajoutés à la colonne et centrifugés à la vitesse maximale pendant 30 secondes. 600 µl de tampon de lavage ont été ajoutés à la colonne

et centrifugés de nouveau à la vitesse maximale pendant 30 secondes. Cette étape a été répétée 3 fois. La colonne GFX a été transférée dans un nouveau tube de 1.5 ml et 60 µl de tampon d'élution ont été ajoutés. Le montage a été incubé à la température de la pièce pendant 1 à 5 minutes. Il a été centrifugé à la vitesse maximale pendant 1 minute afin de permettre l'élution de l'ADNc purifié. Ce dernier est finalement déposé dans un concentrateur «SpeedVac» afin de réduire le volume total à 5 µl.

#### *2.5.4 Préparation des marqueurs de réaction cyanines*

Un tube de cyanine3 et de cyanine5 provenant du «CyScribe GFX Purification Kit» ont été dissous dans 72 µl d'eau-DEPC (Amersham). 4.5 µl de chaque marqueur ont été aliquotés dans 16 tubes de 0,5 ml, centrifugés et déposés dans un concentrateur «SpeedVac» afin de les sécher. Ils ont été conservés à 4°C dans le noir jusqu'à leur utilisation.

#### *2.5.5 Couplage de l'ADNc purifié aux marqueurs cyanines*

3 µl de bicarbonate de sodium 0,3 M pH 9,0 ont été ajoutés à l'ADNc purifié. L'ADNc provenant de la souche *YAP2/p426GPD* a été marqué au cyanine3 alors que l'ADNc de la souche *YAP2/p426GPD-YAP2* a été marqué au cyanine5. Un aliquot de marqueur cyanine a été dissous dans 2 µl DMSO 100% et cette suspension a été ajoutée à l'ADNc. Ce mélange a été incubé pendant une heure à la température de la pièce dans le noir. 20 µl d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et 70 µl d'eau ont été additionnés à l'ADNc couplé au marqueur. Le tout a été purifié tel que décrit à la section 2.5.3.

#### *2.5.6 Conception des biopuces*

Les biopuces utilisées contenaient tous les CLO et toutes les régions intergéniques de *S. cerevisiae*. Les oligonucléotides employés pour la synthèse de tous les fragments proviennent de

Research Genetics (Invitrogen). Les produits de PCR ont été resuspendus dans 20  $\mu$ l de DMSO 40% avec le «liquid handler multiprobe II HT EX» (PerkinElmer). Un mélange de 5 ml d'acétate d'ammonium et 17.5 ml d'isopropanol par micro-plaque a été réalisé (Costar-VWR). 180  $\mu$ l ont été ajoutés à chaque rangée de la plaque et transférée dans la plaque de 96 puits. Celle-ci a été centrifugée 20 minutes à 5000 rpm et le liquide a été enlevé. Un lavage de la plaque a été exécuté avec 200  $\mu$ l d'éthanol 70%. La plaque a été centrifugée 5 minutes à 5000 rpm et le liquide a encore une fois été enlevé. Les produits de PCR ont été imprimés sur des puces traitées à la poly-L-lysine à l'aide du «Arrayer OmniGrid 100» avec 48 épingles de «ArrayIt SMP23 stealth Micro Spotting pins» à une humidité de 55% et à 23-24°C (GeneMachine).

### *2.5.7 Hybridation, lavages et lecture des résultats*

1.2 g d'anhydride succinique ont été dissous dans 72 ml de 1-méthyl-2-pyrrolidinone et 3,3 ml d'acide borique 1 M ont été ajoutés. Cette solution de blocage a été transférée dans une jarre Coplin et les puces ont été immergées. Celles-ci ont été incubées 15 minutes en étant vigoureusement secouées. Par la suite, les puces ont été lavées avec du SDS 0.2% pendant 20 secondes à la température de la pièce et avec de l'eau pour un deuxième 20 secondes. Les puces ont été chauffées dans de l'eau à 95°C pendant 2 minutes et immergées dans de l'éthanol 95% à la température de la pièce pendant 1 minute. Elles ont finalement été centrifugées à 1500 rpm pendant 3 minutes. 40  $\mu$ l de tampon d'hybridation (100  $\mu$ l solution DIG easy Hyb, 5  $\mu$ l ARNt basker 10 mg/ml, 5  $\mu$ l ADN de spermes de saumon 10 mg/ml) ont été additionnés à l'ADNc marqué au cyanine3 ou cyanine5, incubés à 95°C pendant 5 minutes et refroidis sur glace pendant 1 minute. Une centrifugation rapide a été effectuée et les ADNc ont été conservés à 42°C jusqu'à leur utilisation. Les puces ont été installées dans la chambre d'hybridation et 60  $\mu$ l d'ADNc marqué sont déposés sur les puces. Ces dernières ont été recouvertes d'un couvercle et incubées à 42°C pendant toute la nuit. Le lendemain, les puces ont été lavées 2 fois pendant 15 minutes à 42°C dans une jarre Coplin avec du SSC 1X /SDS 0,1%. Une fois les lavages terminés, les puces ont été rincées deux fois à la température de la pièce avec du SSC 1X et une fois avec du SSC 0,1X. Elles ont été centrifugées à 1500 rpm pendant 3 minutes et la lecture des résultats a été effectuée à l'aide du digitaliseur Genepix 4000B (Axon Instrument).

### 2.5.8 Analyse des résultats

Une macro d'Excel Microsoft adaptée par le Dr François Robert de celle utilisée par Hughes *et al.* a servi à l'analyse des résultats (57). Tous les gènes ayant une valeur p de 0.001 ont été conservés. Les gènes sélectionnés ont été classifiés dans des catégories fonctionnelles selon la base de données «*Saccharomyces Genome Database*» (SGD, <http://www.yeastgenome.org>).

## 2.6 Essai $\beta$ -galactosidase

Les essais ont été réalisés tel que décrit précédemment (89). Brièvement, les cellules ont été cultivées dans 10 ml de milieu SD-ura-leu toute la nuit et ont ensuite été diluées à une  $DO_{600}$  de 0,4 dans 20 ml de milieu. Lorsque les cellules ont atteint une  $DO_{600}$  de 1.0, elles ont été récoltées par centrifugation, rincées avec du tampon Z (60 mM  $Na_2HPO_4$ , 40 mM  $NaH_2PO_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $MgSO_4$ , 50 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol) et resuspendues dans 0.2 ml de tampon Z. Des billes de verre ont été ajoutées jusqu'au culot de cellules et le tout a été vortexé 5 fois pendant une minute. Entre chaque session de vortex, les cellules ont été conservées pendant 1 minute sur glace. Les extraits cellulaires ont ensuite été centrifugés et le surnageant a été transféré dans un nouveau tube. La concentration des protéines a été déterminée par la méthode de Bradford en utilisant l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard (15). L'essai  $\beta$ -galactosidase a finalement été réalisé en utilisant 80  $\mu$ g de protéines. L'activité  $\beta$ -galactosidase a été obtenue en évaluant l'hydrolyse de l'*o*-nitrophénol- $\beta$ -D-galactoside, quantifiée par la mesure de la  $DO_{420}$  et exprimée en unités d'*o*-nitrophénol formées/minute/mg de protéines utilisées.

## 2.7 Construction d'une souche *YAP2-MYC*

### 2.7.1 Intégration d'une étiquette *MYC* au locus *YAP2*



Les oligonucléotides utilisés pour la construction de la souche et pour l'expérience d'immunoprécipitation de la chromatine sont montrés dans la Table 3. Afin d'intégrer une étiquette *MYC* au locus *YAP2*, le vecteur pMPY-3xMYC a été utilisé et généreusement fourni par le Dr François Robert, IRCM, Montréal, Canada (121). Les oligonucléotides utilisés pour l'intégration de l'épitope *MYC* au locus *YAP2* ont été synthétisés par la compagnie Alpha DNA (<http://www.alphadna.com>). L'oligonucléotide sens employé pour l'amplification contenait les 50 dernières bases du CLO de *YAP2* (excluant le codon stop) suivies de 16 bases provenant du vecteur pMPY-3xMYC (soulignées dans la Table 3). L'oligonucléotide anti-sens contenait les 50 bases suivants le CLO de *YAP2* (le brin complémentaire) et 16 bases du vecteur pMPY-3xMYC (soulignées dans la Table 2). Cette stratégie permet l'intégration de la cassette par recombinaison au locus *YAP2* (fig. 11. A). Le PCR a été réalisé à l'aide de l'ADN polymérase *Taq* et l'ADN du plasmide pMPY-3xMYC a été utilisé comme gabarit. Les produits de 8 réactions de PCR ont été rassemblés et la longueur du fragment a été vérifiée sur gel à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire. Les produits ont été nettoyés par le phénol-chloroforme-alcool isoamyle (25 ml phénol, 24 ml chloroforme, 1 ml alcool isoamyle, Sigma). Par la suite, les produits de PCR ont été précipités à l'éthanol 100% et resuspendus dans 10 µl de TE pH 8,0. 1 µl a été déposé sur gel afin de vérifier la qualité et la quantité approximative de l'ADN récupéré. Les cellules compétentes ont été préparées la veille et conservées à 4°C toute la nuit (62). Quatre à cinq mg d'ADN ont été transformés dans la souche sauvage BY4741. Dix colonies ont été obtenues.

Afin de vérifier que l'intégration s'était bien faite au locus *YAP2*, le criblage a été réalisé par PCR. Pour ce faire, huit colonies isolées des intégrants ont été cultivées toute la nuit dans 10 ml de milieu SD-ura liquide. La culture a été centrifugée et resuspendue dans 200 µl de tampon de lyse (50 mM HEPES pH 7,5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% Na-désoxycholate). Des billes de verre ont été ajoutées jusqu'au culot de cellules et le tout a été vortexé 5 fois pendant une minute. Entre chaque session de vortex, les cellules ont été conservées pendant 1 minute sur glace. Les extraits cellulaires ont été centrifugés et le surnageant a été nettoyé au phénol-chloroforme-alcool isoamyle, précipité à l'éthanol 100% et resuspendu dans 13 µl de TE pH 8,0. Un PCR a été effectué afin de vérifier l'exactitude de l'intégration à l'aide d'un oligonucléotide se liant au gène *YAP2* et un s'hybridant au 3'-UTR (Table 3, fig. 11A). Sur les huit colonies testées, trois avaient intégré la cassette au bon endroit.

**Table 3. Oligonucléotides utilisés pour la construction d'une souche *YAP2-MYC* et pour l'expérience d'immunoprécipitation de la chromatine.** a : les positions sont relatives au codon d'initiation de la transcription, b : les conditions de PCR sont 1' à 94°C, 1' à la T<sub>m</sub> indiquée, le T indiqué à 72°C, répétées 30 fois et conservées à 4°C, c : s :oligonucléotide sens, d : as :oligonucléotide anti-sens, e : les séquences soulignées dérivent du vecteur pMPY-3xMYC (121), f : les conditions de PCR pour le ChIP sont : 1' 30" à 95°C, 40" à 95 °C, 40" à 50°C, 40" à 72°C. Les trois dernières étapes ont été répétées 24 fois. ' : minute, " : seconde.

Gène	Nom	Séquences (5'-3')	Positions dans le CLO <sup>a</sup>	Conditions de PCR <sup>b</sup>
<i>YAP2-MYC</i>	MR612	s <sup>c</sup> TAGTAGTCAAAGCTCGCGACTTACAGAGTGCTC	+1177 à +1227	T <sub>m</sub> :54°C
	MR613	as <sup>d</sup> TGG TAGACAGCTCCTGAGGGAACAAAGCTGG <sup>e</sup> TATTACATGCTCTCATCCAACATTATGTATACT CAAGATATGTTTATATCTATAGGGCGGAATTGG	+1233 à +1283 (stop à +1230)	T:35"
<i>YAP2</i> (criblage)	MR837	s ATAACAAGCCACCTGTTGAA	+1221 à +1250	T <sub>m</sub> :50°C
	MR838	as GATCCTGAGTAGAAGGACTG	+1811 à +1830	T:4'15"
<i>FRM2P</i> (ChIP)	MR855	s GTCTGCGAGTGTACTTGAT	-303 à -283	T <sub>m</sub> :50°C <sup>l</sup>
	MR858	as CTCTCTTCGATCACAAACATG	-81 à -100	T:40"
<i>SPS4P</i>	FR604	s CGCCACAAAAACGTATCATTTG	-172 à -192	T <sub>m</sub> :50°C <sup>l</sup>
		as TTGATGGCATGTTTGTGTTGAA	-9 à +10	T:40"

L'excision du marqueur *URA3* et du deuxième épitope *MYC* a été accomplie. Pour y arriver, la souche *YAP2-MYC* # 4, ayant intégré correctement la cassette, a été cultivée toute la nuit dans 5 ml de YPD. 5 µl de cette culture ont servi à inoculer à nouveau 5 ml de YPD et ont été cultivés une deuxième fois toute la nuit. 200 µl de cette deuxième culture ont été centrifugés et resuspendus dans 200 µl d'eau stérile. Le culot resuspendu a été étalé sur des pétris contenant de l'acide 5-fluoro-orotique (7 g YNB, 100 ml glucose 20%, 500 ml agar 4%, 25 ml uracil 2 mg/ml, 1 g 5-fluoro-acide orotique) et incubé 3-4 jours à 30°C. De petites et de grosses colonies ont été obtenues. Une petite et une grosse colonies ont été étalées sur un pétri contenant du YPD afin d'obtenir des colonies isolées. Ensuite, la vérification de l'excision du marqueur a été effectuée. Pour ce faire, une culture de 10 ml de YPD ayant été cultivée toute la nuit a été centrifugée et resuspendue dans 200 µl de tampon de lyse additionné d'inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 10 µg/ml aproptinine, 1 µg/ml leupeptine, 1 µg/ml pepstatine). Le culot resuspendu a été vortexé avec des billes de verre comme décrit précédemment. Une fois la centrifugation effectuée, la moitié du surnageant a été mis de côté afin d'effectuer une analyse Western (voir section 2.7.2). L'autre moitié a été nettoyée tel que décrit précédemment et resuspendue dans 10 µl de TE pH 8,0. Pour vérifier que l'excision avait bien eu lieu, un PCR a été réalisé en utilisant les mêmes oligonucléotides employés pour vérifier l'intégration. Les deux colonies testées, *YAP2-MYC* # 4-1 et *YAP2-MYC* # 4-2, avaient bien excisé la cassette.

### 2.7.2 Caractérisation de la souche par analyse Western

Afin de vérifier que la protéine de fusion Yap2p-Myc était correctement exprimée, une analyse Western a été exécutée. 6 µl de Leammli 5X a été additionnés au 24 µl du surnageant mis de côté précédemment (voir section 2.7.1). Les protéines ont été migrées sur un gel SDS-PAGE. Par la suite, le gel a été équilibré dans le tampon de transfert pendant 20 minutes (2,9 g glycine, 5,8 g Tris, 0,37 g SDS, 200 ml méthanol). Les protéines ont été transférées sur une membrane Bio-Rad en suivant les indications fournies avec l'appareil Trans-blot semi-dry (Bio-Rad). La membrane a été incubée dans une solution d'hybridation TBS-Tween 20 (TBS-T, 10 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) additionnée de 5% de lait (TBS-T-lait) pendant 1 heure. Elle a ensuite été incubée pendant 1 heure dans une nouvelle solution TBS-T-

lait additionnée de d'une dilution 1/300 de l'anticorps MYC 9E10 (Santa Cruz Biotech). Suite à l'incubation, la membrane a été lavée deux fois pendant 10 minutes dans une solution de TBS-T. La membrane a finalement été incubée pendant 1 heure dans une solution de TBS-T-lait additionnée d'une dilution 1/1000 de l'anticorps secondaire IgG-HRP (Santa Cruz Biotech). Suite à l'incubation, la membrane a été lavée deux fois pendant 10 minutes dans une solution de TBS-T. La révélation s'est fait tel que décrit par le protocole «ECL-Plus» (Qiagen).

## 2.8 Immunoprécipitation de la chromatine

### 2.8.1 Jour 1 : Croissance des cellules et «cross-link» protéine-ADN

Des cellules sauvages BY4741 et étiquetées *YAP2-MYC* # 4-1 ont été décongelées sur pétri afin qu'elles poussent et forment des colonies isolées. Par la suite, à partir d'une culture inoculée avec une colonie isolée et ayant poussé toute la nuit, une nouvelle culture de 100 ml a été inoculée à une  $DO_{600}$  de 0,1. Lorsque cette dernière a atteint une  $DO_{600}$  de 0,8, la culture a été traitée par 2,5 mM de diamide pendant 1 heure avec agitation. Les cellules induites ont été transférées dans un tube de 50 ml contenant 1,4 ml de formaldéhyde et placées pendant 30 minutes à la température de la pièce sur une roue tournante. Le tube a ensuite été centrifugé pendant 5 minutes à 2800 rpm à 4°C. Une fois le surnageant enlevé, le culot a été lavé 3 fois avec 40 ml d'une solution froide de TBS (20 mM Tris-Cl pH 7,5, 150 mM NaCl). Après le dernier lavage, le surnageant a été enlevé et le culot a été resuspendu dans la solution de TBS résiduel. Le culot resuspendu a été transféré dans un tube eppendorf. Ce dernier a été centrifugé pendant 1 minute à 4°C à la vitesse maximale. Le surnageant a été retiré, le culot a été congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

Les billes destinées à immunoprécipiter la chromatine ont été préparées la veille de leur utilisation. Pour ce faire, 50 µl de billes (solution stock à  $4 \times 10^8$  billes/ml c'est-à-dire  $2 \times 10^7$  billes par échantillon) ont été utilisés par échantillon à immunoprécipiter. Ces billes sont déjà liées à des anticorps anti-IgG de souris (Dynabeads Pan Mouse IgG, Dynal Biotech). La quantité totale de billes a été placée dans un tube de 15 ml et centrifugée pendant 1 minute à 3000 rpm. Le

surageant a été enlevé et les billes ont été lavées 2 fois dans 10 ml de PBS contenant 5 mg/ml de BSA (PBS/BSA). Les billes ont finalement été incubées toute la nuit sur une plate-forme tournante à 4°C dans 250 µl de solution de PBS/BSA additionnée d'anticorps Myc 9E10 (2 µl par échantillon à immunoprécipiter. Santa Cruz Biotech).

### *2.8.2 Jour 2 : Immunoprécipitation de la chromatine*

Le lendemain, le culot de cellules a été décongelé et resuspendu dans 700 µl de tampon de lyse additionné d'inhibiteurs de protéases (section 2.7). L'équivalent d'un tube de PCR 0.5 ml de billes de verre a été ajouté. Les cellules ont été brisées 3 fois pendant 10 minutes avec un mini «bead beater» (Biospec) à 4°C. Le fond du tube contenant les billes a été percé à l'aide d'une aiguille 18@1½ et placé dans un nouveau tube. Ce montage a été centrifugé jusqu'à ce que la centrifugeuse atteigne une vitesse de 8000 rpm ou que tout le liquide ait été transféré dans le nouveau tube.

Tout ce qui a été récupéré dans le nouveau tube (contenant la chromatine) a par la suite été soniqué 4 fois 20 secondes à une puissance de 7 (Sonic dismembrator 60, Fisher Scientific). Entre chaque séance de sonification, les tubes ont été placés sur glace. Les tubes ont été centrifugés 5 minutes à 13 000 rpm à 4°C et le surageant a été transféré dans un nouveau tube. 5 µl d'extrait cellulaire total ont été mis de côté et conservés à -20°C. Ceux-ci serviront de contrôle. 500 µl de ce même extrait ont servi à l'immunoprécipitation.

Les billes préparées la veille ont été centrifugées 1 minute à 3000 rpm et lavées 2 fois avec 10 ml de PBS/BSA. Elles ont été resuspendues dans 30 µl de PBS/BSA par échantillon. 30 µl de billes ont été ajoutées au 500 µl d'extrait cellulaire total et le tout a été incubé toute la nuit sur une plate-forme tournante à 4°C.

### *2.8.3 Jour 3 : Récupération de l'ADN immunoprécipité*

À 4°C, les extraits ont été lavés 2 fois avec 1 ml de tampon de lyse (sans inhibiteurs de protéases), 2 fois avec 1 ml de tampon de lyse + 360 mM NaCl. 2 fois avec 1 ml de tampon de lavage (10 mM Tris pH 8.0, 250 mM LiCl, 0.5% NP40, 0.5% Na-désoxycholate, 1 mM EDTA) et finalement, 1 fois avec 1 ml de TE pH 8.0. Les billes lavées ont été centrifugées 3 minutes à 3000 rpm et tout le surnageant a été enlevé. Les billes ont été resuspendues dans 50 µl de TE + 1% SDS (TE/SDS). 50 µl de TE/SDS a également été ajouté à l'extrait cellulaire total mis de côté (5 µl). Les tubes ont été vortexés quelques secondes et incubés toute la nuit à 65°C afin de défaire le pontage.

#### 2.8.4 Jour 4 : Précipitation de l'ADN immunoprécipité et PCR

Les tubes contenant les billes ont été centrifugés et le surnageant a été récupéré. Un mélange a été préparé (345 µl de TE, 2 µl de glycogène 20 mg/ml (Roche) et 3 µl de RnaseA 10 mg/ml (Amersham) par échantillon) et 350 µl de ce mélange ont été répartis dans chaque tube. Ceux-ci ont été incubés pendant 2 heures à 37°C. Par la suite, 15 µl de SDS 10% et 7.5 µl de protéinase K 10 mg/ml (Invitrogen) ont été ajoutés dans chaque tube et incubés de nouveau pendant 2 heures à 37°C. L'ADN a été lavé 2 fois avec un mélange phénol-chloroforme-alcool isoamyl. 12 µl de NaCl 5 M et 2,5 volumes d'ÉtOH 100% ont été ajoutés après le deuxième lavage. Les tubes ont été centrifugés pendant 20 minutes à 4°C. L'ADN précipité a été lavé à l'ÉtOH 70% et resuspendu dans 50 µl de TE.

Des PCR ont été effectués sur les extraits cellulaires totaux et sur l'ADN immunoprécipité (voir les détails à la section 3.4). Un mélange a été préparé pour tous les échantillons (extraits cellulaires totaux et immunoprécipités) + 2 : 0,05 µl ATP- $\alpha$  P<sup>32</sup>, 0,35 µl dNTPs 10 mM, 1,5 µl tampon de réaction 10X (100 mM Tris-Cl pH 8,4, 0,5 M KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% gélatine), 0,15 µl de chaque oligonucléotide 40 picomoles/µl, 0,15 µl Taq polymérase, complété à 14 µl d'eau par réaction. Dans chaque tube à PCR, 14 µl de ce mélange et 2 µl d'ADN immunoprécipité ou 1 µl de la dilution choisie de l'extrait cellulaire total ont été déposés. Les

conditions du PCR ont été : 95°C pendant 1 minute 30 sec., 95°C pendant 40 sec., 50°C pendant 40 sec., 72°C pendant 40 sec., refaire les 3 dernières étapes 24 fois.

### *2.8.5 Jour 5 : Révélation des résultats*

Un gel 6% acrylamide a été préparé afin de visualiser les résultats. Une fois les réactions de PCR terminées, 6 µl de colorant de migration (35% glycérol, 0,25% bleu de bromophénol, 0,25% xylène cyanol FF) ont été ajoutés. Seulement 10 µl ont été utilisés pour charger les puits. Le reste a été conservé à 4°C. Une fois les échantillons migrés, le gel a été transféré sur un papier Wathman, séché pendant 15 minutes à 80°C et déposé dans une cassette contenant un écran intensifiant Phosphoryl Imager pendant 60 minutes. De manière qualitative, les quantités de la bande contrôle ont été estimées. Par la suite, les quantités à déposer sur un deuxième gel d'acrylamide ont été évaluées afin que la quantité de la bande contrôle soit équivalente dans chaque puit.

## **2.9 Analyses bioinformatiques**

Un «blast» de protéine-protéine à partir de la banque de données du «National Center for Biotechnology Information» (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a été effectué en utilisant la séquence protéique de Frm2p obtenue de SGD (<http://www.yeastgenome.org>). Les séquences résultantes du «blast» ont été transférées successivement du programme d'alignement de séquences d'EMBOSS (The European Molecular Biology Open Software Suite) au programme d'encadrement des acides aminés Gene Doc ((115), <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>).



## **CHAPITRE 3 : PRÉSENTATION ET ANALYSE DES RÉSULTATS**

### **3.1 Identification des cibles transcriptionnelles de Yap2p**

#### *3.1.1 Choix du système expérimental*

Nous avons choisi l'approche des biopuces afin de caractériser les changements dans le profil d'expression globale des gènes résultant de la surexpression de *YAP2*. Cette approche consistait à comparer le niveau d'expression des gènes dans une souche surexprimant le gène *YAP2* par rapport à une souche sauvage. De par la fonction des gènes répondant à cette surexpression, cette expérience servait également à prédire de nouvelles fonctions de Yap2p dans la cellule. Tel que mentionné précédemment, l'identification de *YAP2* a été réalisée à l'aide d'un système d'expression multicopies (151). En effet, c'est en surexprimant *YAP2* que Wu *et al.* ont pu observer l'apparition de la résistance au cadmium. Le gène avait alors été nommé *CAD1*. Par ailleurs, la surexpression massive d'un facteur de transcription a déjà été utilisée pour des expériences de biopuces. L'exemple le plus typique est celui du proche homologue de Yap2p, Yap1p. C'est en utilisant un vecteur multicopies surexprimant *YAP1* que l'ensemble de ses cibles transcriptionnelles ont pu être déterminé par biopuces (30). La surexpression de ce gène a pour conséquence de reproduire la localisation nucléaire de Yap1p en réponse au stress oxydatif. Tel que décrit plus haut, Yap1p s'accumule au noyau en réponse au stress oxydatif, permettant ainsi l'induction de l'expression de ses cibles. L'oxydation des cystéines présentes dans les deux domaines CRD de Yap1p empêche l'exportine Crm1p de se lier à Yap1p et de l'exporter hors du noyau (voir section 1.4.2.3). La grande quantité de Yap1p produite grâce à la surexpression devient plus importante que l'export fait par Crm1p, conduisant ainsi à l'accumulation de Yap1p au noyau. De par leur forte homologie structurale, nous avons émis l'hypothèse que Yap2p pourrait être régulée de manière similaire à Yap1p. Par conséquent, la surexpression de *YAP2* provoquerait son accumulation dans le noyau, lui permettant d'activer ses cibles.

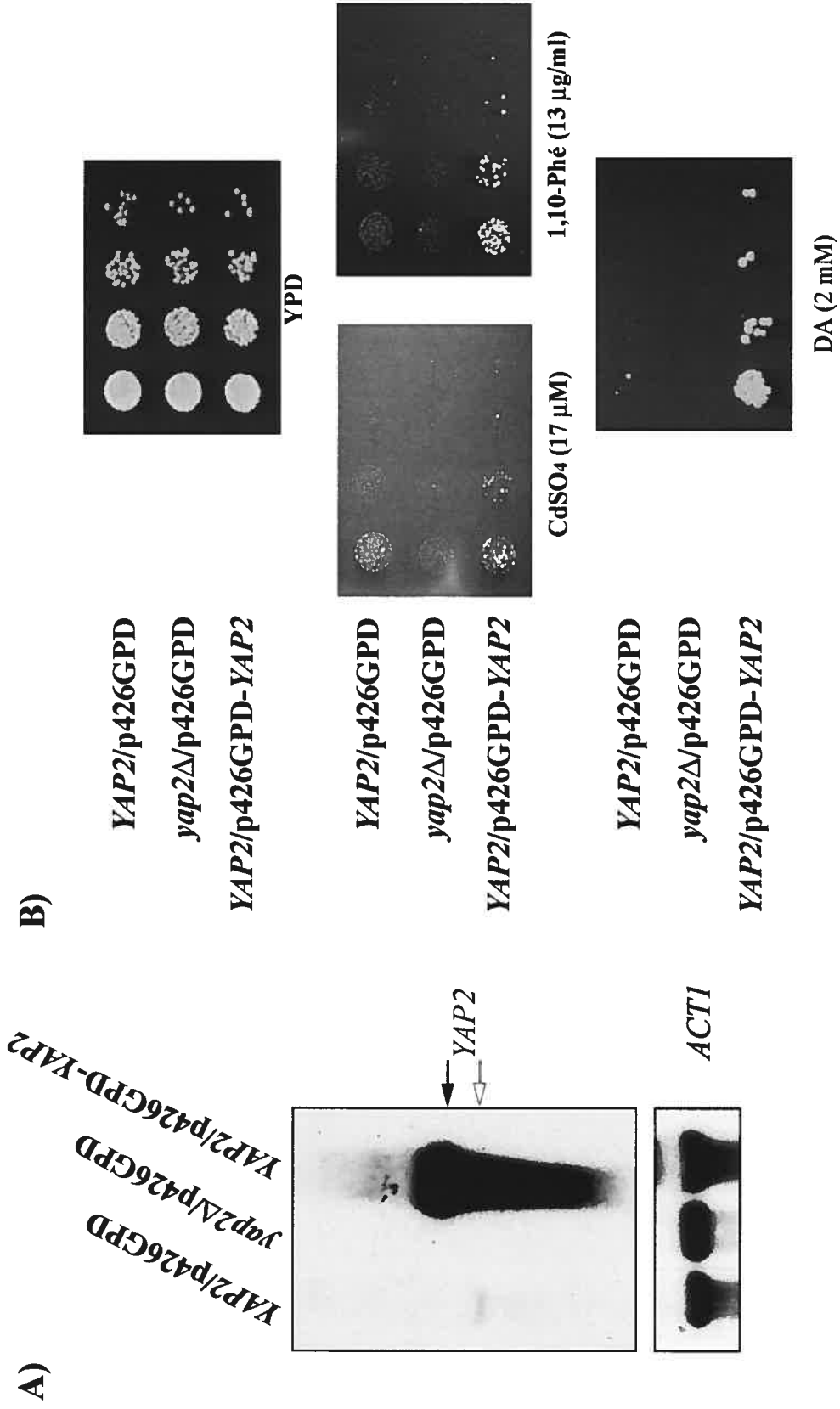
### 3.1.2 Construction et caractérisation des souches

La souche sauvage BY4741 (*YAP2*) a été transformée avec le plasmide multicopies p426GPD-*YAP2* contenant le CLO de *YAP2* sous le contrôle du promoteur fort de la glycéraldéhyde-3-phosphates déshydrogénase (GPD) ou avec le vecteur vide comme contrôle. Dans le but d'évaluer le niveau d'expression de *YAP2* dans ces souches, une analyse de type Northern a d'abord été effectuée. Le gène *ACT1* a été utilisé comme contrôle de la quantité d'ARN chargé dans les puits et de la qualité du transfert. Comme anticipé, la souche *YAP2*/p426GPD détecte un message de 1.2 kb, montrant ainsi le niveau d'expression endogène de *YAP2* (fig. 5A). La souche 4259 (*yap2Δ*) transformée avec le vecteur vide a été utilisée comme contrôle. À cet effet, aucun signal n'a été détecté au niveau de l'ARN de cette souche, confirmant que le message de 1,2 kb observé correspond au transcrit du gène *YAP2*. Finalement, une très grande quantité d'un message d'environ 1,5 kb a été identifiée dans la souche *YAP2*/p426GPD-*YAP2*, correspondant à l'ARNm de *YAP2* transcrit à partir du plasmide de surexpression. Ce résultat montre que *YAP2* est largement surexprimé dans la souche *YAP2*/p426GPD-*YAP2*.

Par la suite, l'habileté de ses souches à reproduire les phénotypes connus causés par la surexpression ou l'absence de *YAP2* en réponse à divers agents oxydants a été examinée. Pour atteindre cet objectif, des tests de résistance aux oxydants ont été exécutés. Le transformant *yap2Δ*/p426GPD a été utilisé comme contrôle afin de confirmer l'hypersensibilité aux oxydants causée par l'absence de *YAP2*. De plus, ce transformant a permis de vérifier que l'incorporation du plasmide n'affecte pas l'hypersensibilité aux oxydants engendrée par l'absence de *YAP2*. Il est connu que la délétion de *YAP2* confère l'hypersensibilité au cadmium alors que sa surexpression amène la résistance au cadmium et au 1,10-phénantroline (11;80;129). Tel qu'attendu, la souche *yap2Δ*/p426GPD est hypersensible au cadmium comparativement à la souche sauvage tandis que la souche surexprimant *YAP2* est résistante au cadmium et au 1,10-phénantroline (fig. 5B). Ces résultats confirment bien que *YAP2* est impliqué dans la réponse au stress oxydatif et récapitulent parfaitement les phénotypes connus. Conséquemment, les souches *YAP2*/p426GPD et *YAP2*/p426GPD-*YAP2* peuvent être utilisées pour les expériences de puces à ADN.

**Fig. 5 Caractérisations des souches utilisées pour les biopuces.**

A) Analyse Northern. Les transformants ont poussé jusqu'à une  $DO_{600}$  de 1.0. L'ARN total a été extrait et 20  $\mu$ g de chaque extrait ont été analysés par Northern blot avec une sonde *YAP2*-P<sup>32</sup>. La flèche pleine indique l'ARNm codé par p426GPD-*YAP2* (1,5 kb) alors que la flèche vide représente l'ARNm codé par le gène *YAP2* endogène (1.2 kb). Le niveau de l'ARNm de l'*ACT1* est inclus comme contrôle de la quantité des ARN. B) Tests de résistance aux oxydants. Les transformants ont été cultivés toute la nuit et ont été resuspendus à une  $DO_{600}$  de 0,1. Trois microlitres de dilutions successives un dans cinq ont été déposés sur des pétris ne contenant pas d'oxydant (YPD) ou contenant du sulfate de cadmium ( $CdSO_4$ ), du 1,10-phénantroline (1,10-Phé) ou du diamide (DA). Les pétris ont été incubés 2 jours à 30°C.



Par ailleurs, nos résultats montrent que la souche *yap2Δ/p426GPD* est légèrement sensible au 1,10-phénantroline. Comme cette sensibilité n'a jamais été observée alors il se peut qu'elle soit dépendante de la souche testée. De plus, nos résultats indiquent que la souche surexprimant *YAP2* confère également la résistance au diamide comparativement à la souche sauvage tandis que sa délétion n'entraîne pas une hypersensibilité (fig. 5B et résultat non montré). À notre connaissance, c'est la première fois qu'on observe que *YAP2* est impliqué dans la réponse au stress oxydatif causée par une exposition des cellules au diamide.

### 3.1.3 Expérience des puces à ADN

L'expérience des biopuces a identifié des cibles transcriptionnelles potentielles de *YAP2* et ainsi établi une liste de gènes pouvant agir comme effecteur de Yap2p dans les phénotypes d'hypersensibilité ou de résistance dépendant de la présence de Yap2p. Les souches *YAP2/p426GPD* et *YAP2/p426GPD-YAP2* ont servi à cette expérience. Les détails de la méthodologie sont présentés à la section 2.5. Brièvement, l'ARN de ces souches a été extrait et la transcription inverse a été effectuée. L'ADNc provenant de la souche *YAP2/p426GPD* a été marqué au cyanine3 et l'ADNc de la souche *YAP2/p426GPD-YAP2* a été marqué au cyanine5. Ceux-ci ont été hybridés sur les biopuces qui contenaient les régions intergéniques et les CLO de *S. cerevisiae*. Les expériences ont été faites en triplicata sur trois lots d'ARN indépendants. Les résultats ont été analysés à l'aide d'une macro adaptée de Hughes *et al.* par le Dr François Robert (57). Tous les gènes ayant une valeur p inférieure à 0.001 ont été conservés. Les gènes sélectionnés ont été classifiés en catégories fonctionnelles selon la base de données SGD et sont présentés à la Table 4.

Trente-neuf gènes ont été obtenus par cette approche. Premièrement, le gène *YAP2* est régulé à la hausse 3,2 fois, ce qui confirme la surexpression de *YAP2*. Aussi, 0,5% des CLO de *S. cerevisiae* (6569 CLO) répondent à la surexpression de *YAP2*, avec seulement deux gènes régulés à la baisse (*PHO84* et *HAC1*). Brièvement, la surexpression de *YAP2* induit l'expression de plusieurs gènes dont les produits sont des transporteurs impliqués dans la résistance aux métaux et aux composés toxiques. Il s'agit entre autres de *FLR1*, codant pour un transporteur de type

**Table 4. Gènes dont l'expression est modulée suite à la surexpression de *YAP2*.**

La colonne ratio montre le changement d'expression des gènes par rapport à la surexpression de *YAP2* versus la souche sauvage. Les gènes ont été classifiés en catégories fonctionnelles selon la base de données SGD.

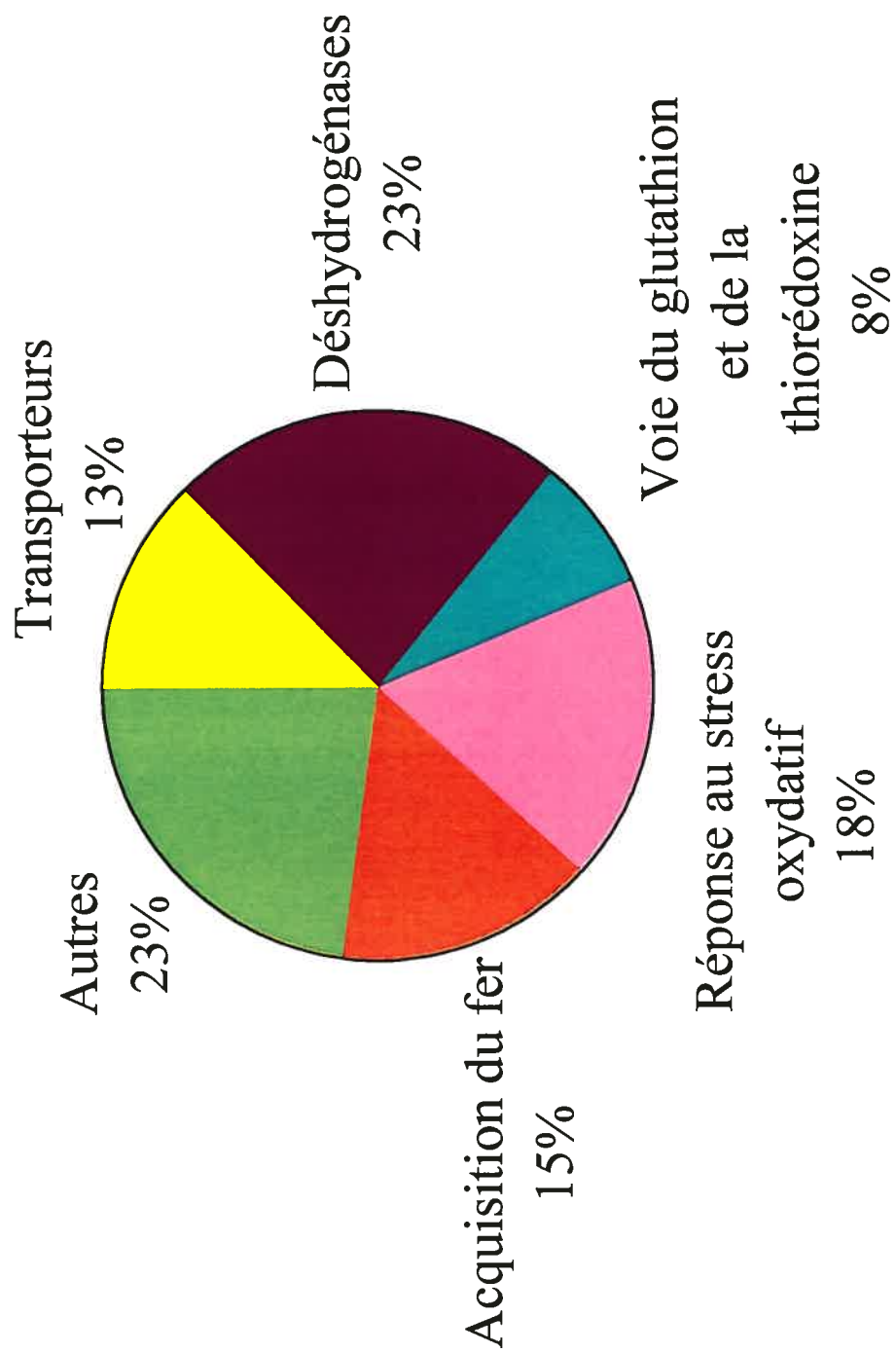
CLO	Gène	Ratio	Description des gènes	Références
<b>1. Transporteurs</b>				
YBR008c	<i>FLR1</i>	20.3	Transporteur de la famille des facilitateurs	1
YPR201w	<i>ARR3</i>	4.7	Transporteur de la famille des facilitateurs	155
YDR135c	<i>YCF1</i>	4.7	Transporteur ABC	84
YML116w	<i>ATR1</i>	3.6	Transporteur de la famille des facilitateurs	70
YML123c	<i>PHO84</i>	-2.5	Transporteur de la famille des facilitateurs	SGD
<b>2. Déshydrogénases</b>				
YPL171c	<i>OYE3</i>	29.2	Déshydrogénase de NAD(P)H	104
YDL243c	<i>AAD4</i>	25.8	Déshydrogénase d'aryl-alcool	28
YFL057c	<i>AAD16</i>	20.2	Déshydrogénase d'aryl-alcool	28
YNL331c	<i>AAD14</i>	16.5	Déshydrogénase d'aryl-alcool	28
YFL056c	<i>AAD6</i>	16.5	Déshydrogénase d'aryl-alcool	28
YOL165c	<i>AAD15</i>	15.7	Déshydrogénase d'aryl-alcool	28
YJR155w	<i>AAD10</i>	8.5	Déshydrogénase d'aryl-alcool	28
YNL134c		6.8	Déshydrogénase d'aryl-alcool	SGD
YHR179w	<i>OYE2</i>	4.7	Déshydrogénase de NAD(P)H	104
<b>3. Voie du glutathion et de la thiorédoxine</b>				
YLL060c	<i>GTT2</i>	16.9	Transférase de glutathion	22
YBR244w	<i>GPX2</i>	2.7	Peroxydase de glutathion	59
YDR353w	<i>TRR1</i>	2.3	Réductase de thiorédoxine	92
<b>4. Acquisition du fer</b>				
YOR382w	<i>FIT2</i>	5.8	Impliqué dans le transport du fer	118
YLR214w	<i>FRE1</i>	3.5	Réductase de cuivre et de fer	118
YOR383w	<i>FIT3</i>	2.9	Impliqué dans le transport du fer	118
YEL065w	<i>ARN3</i>	2.6	Transporteur de ferrioxamine B	79
YOL158c	<i>ARN4</i>	2.3	Transporteur d'entérobactine	79
YMR058w	<i>FET3</i>	2.2	Ferroxydase	79
<b>5. Réponse au stress oxydatif</b>				
YGR234w	<i>YHB1</i>	7.9	Flavohaemoglobine	160
YDR533c	<i>HSP31</i>	3.5	Similaire à Hsp31p d' <i>E. coli</i>	SGD
YNR074c	<i>CPD1</i>	3.4	Oxydoréductase putative	135
YDR423c	<i>YAP2</i>	3.2	Facteur de transcription de type bZIP	151
YMR038c	<i>LYS7</i>	3.2	Chaperone de la superoxyde dismutase Sod1p	39
YBR046c	<i>ZTA1</i>	2.5	Similaire à une oxydoréductase d' <i>E. coli</i>	SGD
YDR369c	<i>XRS2</i>	2.4	Impliqué dans la réparation de l'ADN	SGD
YFL031w	<i>HAC1</i>	-2.6	Facteur de transcription de type bZIP	93
<b>6. Autres</b>				
YCL026c-a	<i>FRM2</i>	30.5	Impliqué dans la voie des acides gras	87
YPR200c	<i>ARR2</i>	11.1	Réductase d'arsenate	155
YIL168w	<i>SDL1</i>	4.5	Déhydratase de L-sérine	SGD
YBR047w		3.4	Protéine localisée dans la mitochondrie	SGD
YIR030c	<i>DCG1</i>	3.3	Sensible aux catabolites nitrogénés	157
YHR199c		3.2	Protéine localisée dans la mitochondrie	SGD
YJR151c	<i>DAN4</i>	2.9	Mannoprotéine	SGD
YDL244w	<i>THI13</i>	2.6	Impliqué dans la biosynthèse du thiamine	SGD
YJR122w	<i>CAF17</i>	2.6	Composant du complexe CCR4	SGD

facilitateur, *ARR3*, codant pour un transporteur d'arsenite et *YCF1*, encodant un transporteur ABC (141). Les résultats des expériences de biopuces montrent également que la surexpression de *YAP2* régule l'expression d'une famille de déshydrogénases d'aryl-alcool (*AAD*) ainsi que celle de deux déshydrogénases de NAD(P)H (*OYE2* et *OYE3*). Les gènes impliqués dans la voie du glutathion *GTT2*, codant pour une transférase de glutathion et *GPX2*, codant pour une peroxidase de glutathion, sont également régulés par Yap2p. De plus, l'expression de plusieurs autres gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif est régulée par la surexpression de *YAP2*. On y retrouve deux gènes codant pour des oxydoréductases potentielles, *LYS7*, qui code pour une chaperone de la superoxyde dismutase Sod1p, *YHB1*, encodant la flavohémoglobine et six gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport du fer. Finalement, une cinquième catégorie a été formée contenant des gènes qui codent pour des protéines ayant des fonctions diversifiées. Cette catégorie contient entre autre *FRM2*, impliqué dans la voie des acides gras, *ARR2*, codant pour une réductase d'arsenate et *DCG1*, un gène dont l'expression est sensible aux catabolites azotés.

En résumé, 13% des gènes répondant à la surexpression de *YAP2* encodent des transporteurs, 23% codent pour des déshydrogénases, 8% codent pour des enzymes impliquées dans la voie du glutathion et de la thiorédoxine, 18% codent pour des protéines répondant au stress oxydatif, 15% codent pour des protéines jouant un rôle dans le transport du fer et 23% des gènes codent pour des protéines ayant des fonctions diverses (fig. 6). Aussi, dix gènes qui ne sont pas énumérés dans la Table 4, sont des CLO hypothétiques. En plus de son rôle dans la réponse au stress oxydatif, cette analyse laisse supposer que Yap2p participe au transport du fer à l'intérieur de la cellule et à la résistance pléiotropique aux composés toxiques. Il semble également que Yap2p joue un rôle dans la détoxification de l'arsenate par la cellule. Il est important de noter, à ce point, que les gènes identifiés l'ont été suite à une surexpression forcée de *YAP2*. Il faudra vérifier si ces gènes fonctionnent bien en tant que cibles transcriptionnelles de Yap2p *in vivo*. Néanmoins, ces résultats sont consistants avec un rôle majeur de Yap2p dans la réponse au stress oxydatif.



**Fig. 6 Répartition selon la fonction des protéines codées par les gènes induits par la surexpression de *YAP2*.** L'importance de chaque catégorie fonctionnelle est représentée par le pourcentage de gènes présents dans cette catégorie par rapport au nombre total de gènes présentés à la Table 4.



### 3.1.4 Validation des résultats par analyse Northern

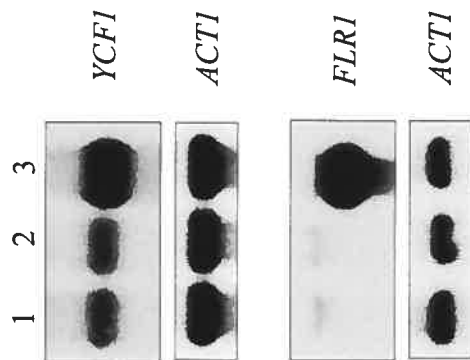
Par la suite, les résultats des expériences de biopuces ont été confirmés par analyse de type Northern à l'aide d'ARN totaux extraits des souches *YAP2/p426GPD*, *yap2Δ/p426GPD* et *YAP2/p426GPD-YAP2*. En plus de confirmer les résultats des biopuces, cette expérience a permis de comparer l'expression des gènes dans les souches *YAP2/p426GPD* et *yap2Δ/p426GPD*. Cela nous permettait d'observer l'influence de la présence de Yap2p endogène sur l'expression des gènes testés. Dix gènes ont été testés provenant des différentes catégories fonctionnelles : *FLR1*, codant pour un transporteur de la famille des facilitateurs, *YCF1* codant pour un transporteur ABC, *AAD4* et *OYE3* codant pour des déshydrogénases, *GPX2*, codant pour une peroxydase de glutathion, *ENB1*, *FIT3* et *FRE1* codant pour des protéines impliquées dans l'acquisition du fer, *FRM2*, codant pour une protéine impliquée dans la voie de signalisation des acides gras et finalement, *ARR2* encodant une réductase d'arsenate (fig. 7). Le gène *ACT1* a été utilisé comme contrôle de la quantité d'ARN chargé dans les puits et de la qualité du transfert. Les résultats de cette expérience montrent que l'expression des gènes testés par Northern blot est fortement induite par la surexpression de *YAP2*, confirmant ainsi les expériences des puces à ADN. Cependant, cette analyse corrobore uniquement de manière qualitative les résultats des biopuces puisque la quantité d'ARN observée est plus ou moins proportionnelle aux ratios trouvés par biopuces.

De plus, ces analyses Northern ont apporté d'autres informations. Premièrement, la moitié des gènes testés ne sont pas exprimés de base (*AAD4*, *ARR2*, *FLR1*, *FRM2* et *OYE3*) dans la souche *YAP2/p426GPD*. Leur expression n'est également pas détectable dans la souche mutante *yap2Δ*. Cette constatation met l'accent sur le fait que la délétion de *YAP2* ne pourra pas avoir un effet notable sur l'expression de base de ces gènes. Ces derniers sont donc des effecteurs potentiels de Yap2p dans le phénotype de résistance au diamide. D'autre part, les cinq autres gènes testés sont exprimés de base dans la souche *YAP2/p426GPD* mais ne répondent pas à la délétion de *YAP2*. Cette observation suggère que les voies impliquant une régulation par Yap2p doivent être activées. Ces derniers résultats, couplés au fait que 95% des gènes trouvés par biopuces sont régulés à la hausse par la surexpression de *YAP2*, suggèrent fortement que Yap2p fonctionne en tant qu'activateur de la transcription et non en tant que répresseur. Aussi,

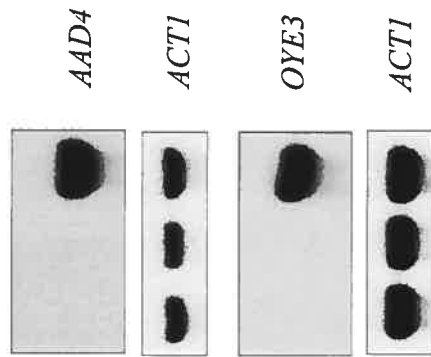
**Fig. 7 Confirmation par Northern blot de gènes répondant à la surexpression de *YAP2*.**

Les transformants ont été cultivés jusqu'à une  $DO_{600}$  de 1,0. L'ARN total a été extrait et 20  $\mu$ g de chaque extrait ont été analysés avec différentes sondes marquées au  $P^{32}$ . Le niveau de l'ARNm *ACT1* est inclus comme contrôle de la quantité des ARN. Tous les ARN ont été placés dans la même séquence : 1 : 4741/p426GPD, 2 : 4259/p426GPD, 3 : 4741/p426GPD-*YAP2*.

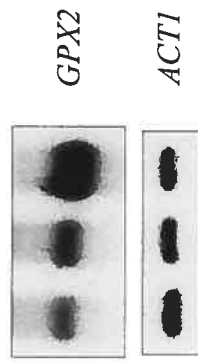
### 1. Transporteurs



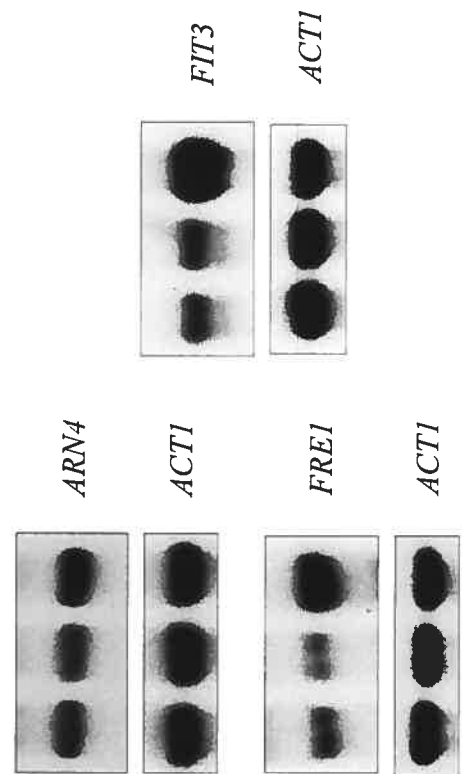
### 2. Déshydrogénases



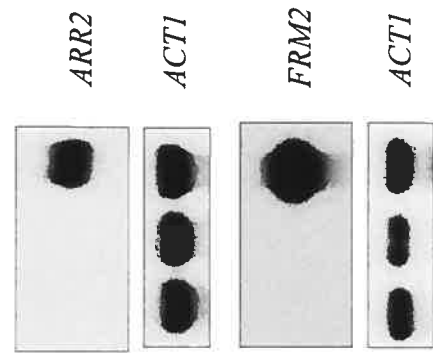
### 3. Voie du glutathion et de la thiorédoxine



### 4. Acquisition du fer



### 5. Autres



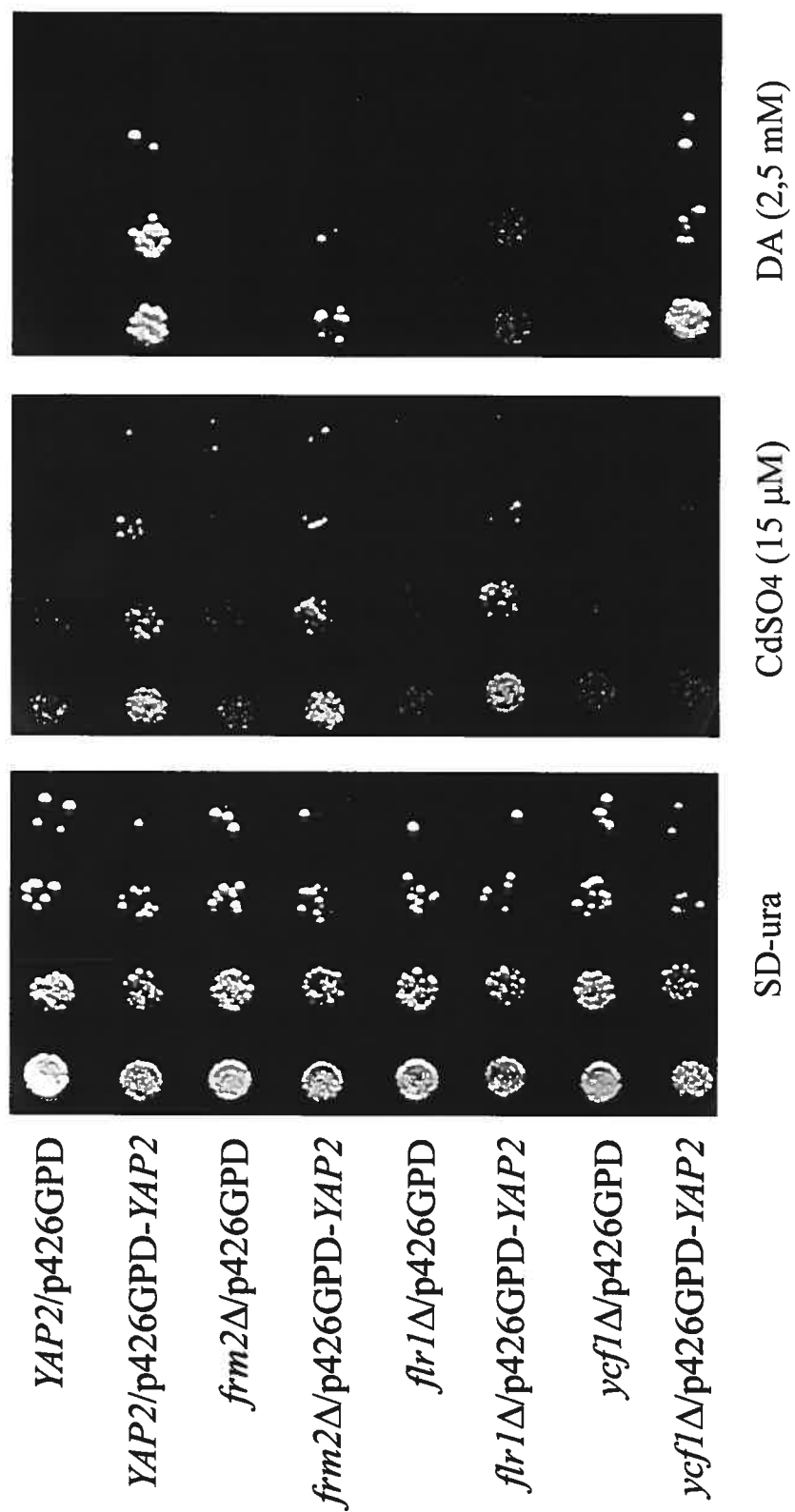
ces analyses confirment notre choix de souches pour l'expérience des biopuces. De fait, si l'expérience avait été de comparer l'expression globale des gènes entre la souche sauvage et celle contenant une délétion de *YAP2*, le changement d'expression de ces dix gènes n'aurait pas été détecté.

### 3.2 Caractérisation fonctionnelle des cibles de Yap2p dans la résistance aux oxydants

Afin de déterminer si les phénotypes de résistance conférés par la surexpression de *YAP2* sont causés par certains gènes trouvés par les biopuces, des tests de résistance aux oxydants ont été effectués. Trois gènes ont été choisis pour plusieurs raisons. D'une part, *FRM2* a été sélectionné puisqu'il est un des gènes les plus induits suite à la surexpression de *YAP2*. D'autre part, son caractère unique a incité son choix puisque c'est la première fois qu'on observe qu'un facteur Yap pourrait réguler un gène impliqué dans le métabolisme des acides gras. *FLR1* a aussi été sélectionné puisque la protéine Flr1p confère la résistance à plusieurs composés toxiques tels le fluconazole, le bénomyle et le méthotrexate et est connue comme étant une cible de Yap1p (1;16). Finalement, nous avons choisi *YCF1* étant donné sa contribution à la résistance au cadmium clairement définie et son expression qui est régulée par Yap1p (41;142). De plus, Flr1p et Ycf1p semblent impliquées conjointement dans la résistance à la diazorine et à la céruléine (69;107). Bref, ces trois gènes apparaissent de bons candidats en tant qu'effecteurs potentiels de Yap2p. Pour vérifier cette possibilité, les souches *frm2Δ*, *flr1Δ* et *ycf1Δ* ont été transformées avec le vecteur surexprimant *YAP2* (p426GPD-*YAP2*) ou le vecteur vide (p426GPD) comme contrôle et la capacité des transformants à résister aux effets du cadmium ou du diamide a été examinée par tests de résistance sur gélose (fig. 8). Les souches *YAP2*/p426GPD et *YAP2*/p426GPD-*YAP2* ont été utilisées comme contrôle puisqu'ils reproduisent les phénotypes connus pour Yap2p (fig. 5B).

Pour ce qui est du test de résistance au cadmium, les souches contrôles reproduisent le phénotype connu soit une croissance plus importante chez la souche *YAP2*/p426GPD-*YAP2* par rapport à la souche *YAP2*/p426GPD. Ces deux mêmes phénotypes ont été observés chez les paires de souches *frm2Δ*/p426GPD et *frm2Δ*/p426GPD-*YAP2* et *flr1Δ*/p426GPD et *flr1Δ*/p426GPD-

**Fig. 8 Tests de l'habileté de gènes répondant à la surexpression de *YAP2* à conférer la résistance à certains oxydants.** Les transformants ont été cultivés toute la nuit et ont été resuspendus à une  $DO_{600}$  de 0,1. Trois microlitres de dilutions successives un dans cinq ont été déposés sur des pétris ne contenant pas d'oxydant (SD-ura) ou contenant du sulfate de cadmium ( $CdSO_4$ ) ou du diamide (DA). Les pétris ont été incubés 3 jours à 30°C.





*YAP2*, montrant que *FRM2* et *FLR1* ne sont pas impliqués dans la résistance au cadmium engendrée par la surexpression de *YAP2*. Cependant, une importante diminution de croissance de la souche *ycf1Δ/p426GPD-YAP2* par rapport à la souche contrôle a été observée, signifiant que la surexpression de *YAP2* dans la souche *ycf1Δ* ne reproduit pas le niveau de résistance observé chez la souche *YAP2/p426GPD-YAP2*. Ce résultat indique que Ycf1p est l'effecteur majeur de Yap2p dans la résistance au cadmium engendrée par la surexpression de *YAP2*.

En ce qui concerne la résistance au diamide, les souches contrôles reproduisent le phénotype connu c'est-à-dire que la souche surexprimant *YAP2* poussent sur un milieu contenant du diamide alors que la souche sauvage est incapable de croître en présence de diamide. En premier lieu, la souche *ycf1Δ/p426GPD-YAP2* se comporte de manière semblable à la souche contrôle, indiquant que *YCF1* n'est pas impliqué dans la résistance au diamide conférée par Yap2p. Toutefois, les souches *flr1Δ* et *frm2Δ* surexprimant *YAP2* poussent moins bien que la souche contrôle surexprimant *YAP2*, démontrant que ces deux gènes jouent un rôle dans la résistance au diamide causée par la surexpression de *YAP2*. Par contre, les souches *flr1Δ/p426GPD-YAP2* et *frm2Δ/p426GPD-YAP2* montrent une croissance résiduelle en présence de diamide. Il se peut que la croissance résiduelle observée soit due à la présence de *FRM2* dans la souche *flr1Δ/p426GPD-YAP2* et vice versa. Aussi, cette croissance implique peut-être l'action d'autres gènes. En résumé, ces tests de résistance aux oxydants démontrent que *YCF1*, *FLR1* et *FRM2* sont des effecteurs de Yap2p dans la résistance aux oxydants conférée par la surexpression de *YAP2*.

### 3.3 Étude des mécanismes de régulation transcriptionnelle de *FRM2* par Yap2p

#### 3.3.1 Choix du gène *FRM2*

En dernier lieu, l'étude des mécanismes de régulation transcriptionnelle de Yap2p a été effectuée. Afin de connaître les éléments nécessaires à l'induction de l'expression des gènes par Yap2p, l'analyse de la régulation de *FRM2* par Yap2p a été réalisée. *FRM2* est un gène très fortement induit identifié par l'expérience des biopuces et est impliqué dans la résistance au

diamide conférée par la surexpression de *YAP2* (Table 4 et fig. 8). De plus, la fonction de Frm2p n'est pas bien connue. Il a été démontré que le gène *FRM2* joue un rôle dans la voie de signalisation des acides gras mais sa fonction précise dans cette voie n'est pas connue. De fait, il a été observé qu'en présence d'acide gras, une mutation dans le gène *FRM2* permet l'expression de la transcription du promoteur *OLE1* fusionné au gène rapporteur *LacZ* (87). Aussi, une étude globale utilisant la technique des deux hybrides a montré que Frm2p s'associe à Are1p, une acyltransférase d'acyl-CoA-stérol (63). Une autre étude d'expression globale a déterminé que *FRM2* est induit par un traitement au 3-amino-triazole 100 mM pendant 1 heure (101). Il était donc intéressant de caractériser le lien entre le gène *FRM2* et un régulateur répondant au stress oxydatif. Conséquemment, tous ces éléments faisaient de *FRM2* un gène de choix pour l'étude de la régulation par Yap2p.

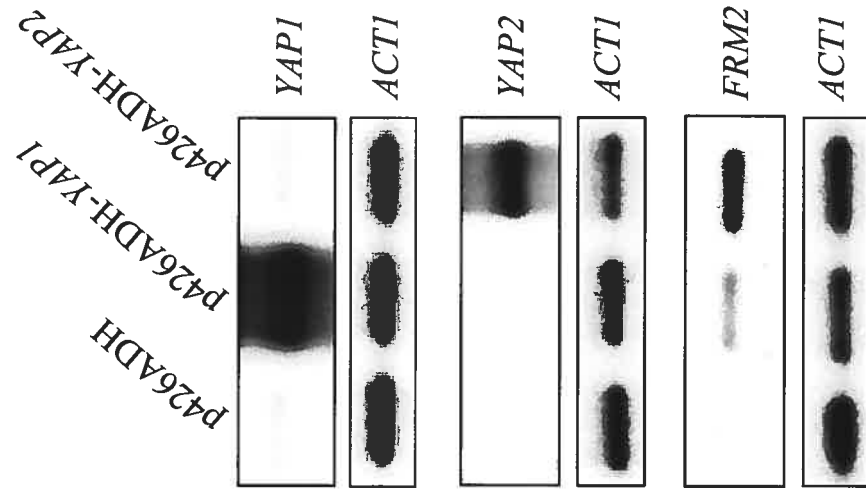
### 3.3.2 Caractérisation de la régulation de l'expression du gène *FRM2* par Yap2p

Étant donné que *FRM2* est un effecteur de Yap2p dans la résistance au diamide, nous avons voulu déterminer si l'expression de *FRM2* est induite suite à une exposition au diamide et, si tel est le cas, si la présence de *YAP2* est requise pour cette induction. Les cellules sauvages, *yap1Δ* et *yap2Δ* ont été traitées ou non au diamide (2,5 mM) pendant 1 heure et l'ARN total a été extrait. Une analyse de type Northern a été effectuée avec ces ARN (fig. 9A). Les souches non traitées ne montrent aucune expression de *FRM2*, tel qu'attendu (fig. 7). Un traitement au diamide induit fortement l'expression de *FRM2* dans la souche sauvage, montrant que l'expression de *FRM2* est régulée par le diamide. Cette induction est diminuée dans la souche *yap1Δ*, suggérant que *YAP1* participe à cette régulation. De plus, l'induction de l'expression de *FRM2* par le diamide est fortement diminuée dans une souche *yap2Δ* exposée au diamide, signifiant que la protéine Yap2p endogène est un régulateur important de l'expression de *FRM2* en réponse au stress oxydatif causée par le diamide et ce, *in vivo*.

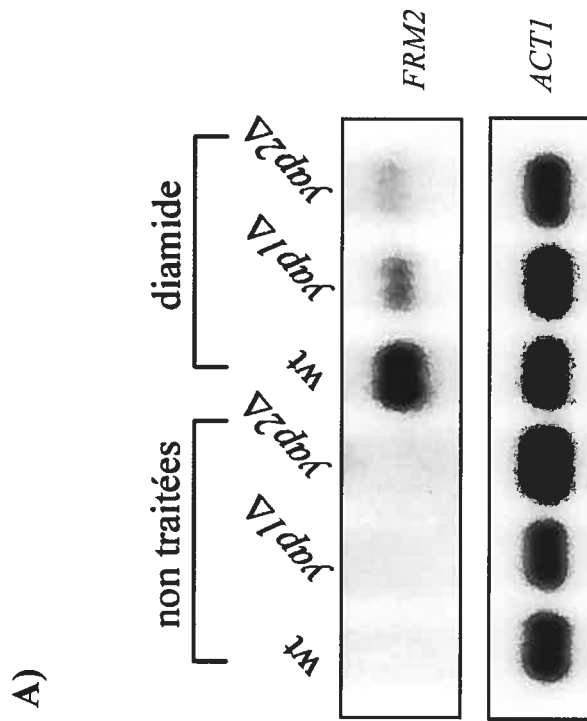
Par la suite, l'induction de l'expression de *FRM2* par Yap2p et Yap1p a été comparée. Pour ce faire, les cellules sauvages ont été transformées avec le vecteur vide (p426ADH) ou les

**Fig. 9 Analyse par Northern blot de la régulation de *FRM2* par *YAP2*.**

A) Les souches sauvage, *yap1* $\Delta$  et *yap2* $\Delta$  ont été cultivées jusqu'à une  $DO_{600}$  de 1.0 et ont été traitées au diamide 2,5 mM pendant 1 heure. L'ARN total a été extrait et 20  $\mu$ g ont été analysés par Northern blot avec une sonde *FRM2*-P<sup>32</sup>. Le niveau de l'ARNm de l'*ACT1* est inclus comme contrôle de la quantité des ARN. B) Les transformants ont poussé jusqu'à une  $DO_{600}$  de 1.0. L'ARN total a été extrait et 20  $\mu$ g ont été analysés avec différentes sondes marquées au P<sup>32</sup>. Le niveau de l'ARNm de l'*ACT1* est inclus comme contrôle de la quantité des ARN.



B)



vecteurs muticopies surexprimant *YAP1* (p426ADH-*YAP1*) ou *YAP2* (p426ADH-*YAP2*) et l'aptitude de ces transformants à induire l'expression de *FRM2* a été analysée par Northern blot.

Les panneaux 1 et 2 ont permis de mesurer le niveau de surexpression de *YAP1* et *YAP2* et de conclure que ce niveau est similaire lorsque normalisé par rapport au niveau d'expression du gène contrôle *ACT1* (fig. 9B). Par contre, ce niveau d'expression représente celui de l'ARN. On ne connaît donc pas la quantité de protéines Yap1p et Yap2p traduites. Néanmoins, ces souches sont adéquates pour comparer le niveau d'induction de *FRM2* par Yap1p et Yap2p. À cet effet, l'expression de *FRM2* est beaucoup plus forte dans la souche qui surexprime *YAP2* comparativement à celle où *YAP1* est surexprimé. Pris dans l'ensemble, ces résultats montrent clairement que l'expression de *FRM2* est induite par Yap1p et Yap2p mais que son expression est régulée plus fortement par Yap2p.

### 3.3.3 Régulation du promoteur *FRM2* par *Yap2p*

Le mécanisme de régulation du gène *FRM2* par Yap2p a été étudié. Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle Yap2p régule l'expression de ses cibles au niveau de leur promoteur. Premièrement, la présence des sites de liaison YRE de Yap1p (TTAGTAA, TTAGTCA, TGACTAA, (103)) ou de la séquence consensus de liaison des facteurs de transcription AP-1 (TGACTCA) a été recherchée dans le promoteur *FRM2*. À première vue, le promoteur *FRM2* ne contient pas d'éléments de régulation connus. Cependant, nous avons identifié 5 YRE atypiques dans lesquels une base est différente des séquences connues et nous les avons nommés YRE 1 à 5, le YRE1 étant celui situé le plus près du site d'initiation de la traduction (fig. 10A). Des délétions séquentielles du promoteur *FRM2* en fusion avec le gène rapporteur *LacZ* ont alors été construites afin d'identifier les séquences *cis* impliquées dans la régulation de *FRM2* par Yap2p. La souche sauvage BY4741 a été transformée avec un vecteur contenant les délétions du promoteur fusionnées au gène *LacZ*, conjointement avec le vecteur surexprimant *YAP2* (p425GPD-*YAP2*) et des essais  $\beta$ -galactosidase ont été effectués. Pour chaque construction, deux clones ont été testés en duplicata lors de trois expériences indépendantes.

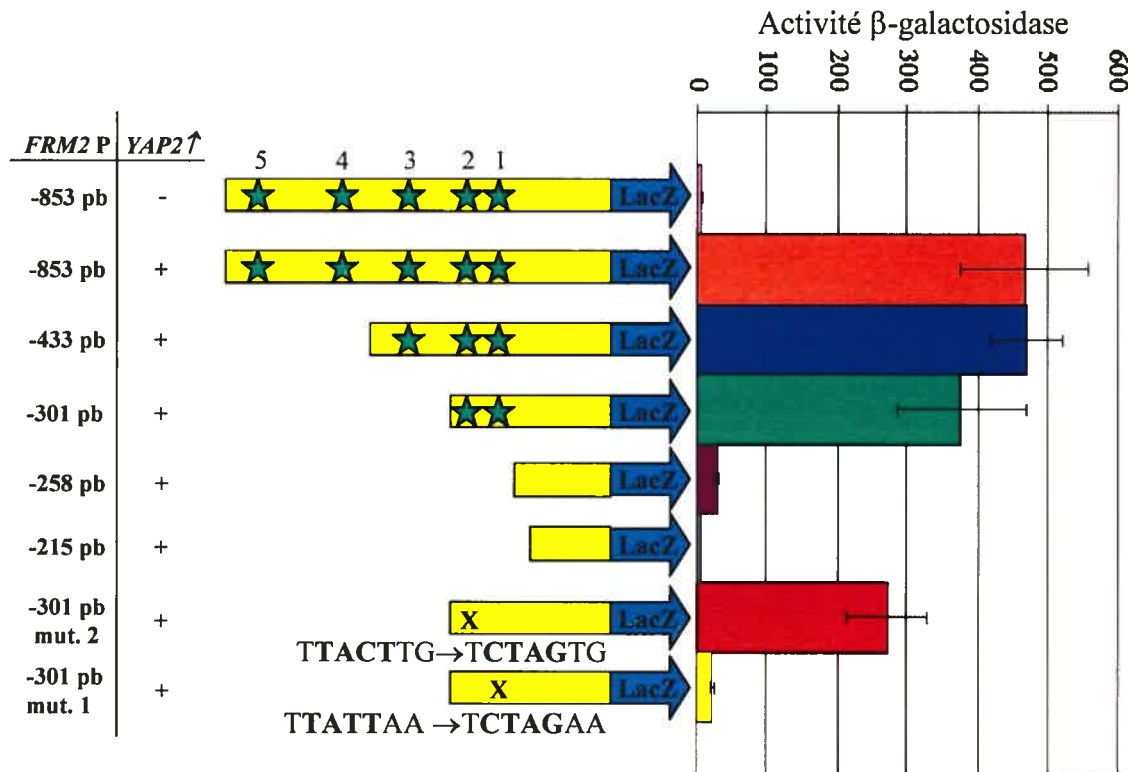
**Fig. 10 Détermination du site de régulation du promoteur *FRM2* par Yap2p.**

A) Analyse de la séquence du promoteur *FRM2*. Les encadrés représentent les YRE atypiques identifiés où la base divergente est en caractère gras. La séquence soulignée montre la boîte TATA alors que la flèche représente le site d'initiation de la traduction. B) Des plasmides contenant des délétions séquentielles du promoteur *FRM2* fusionnées au gène rapporteur *LacZ* ont été transformés en parallèle avec le vecteur vide (p425GPD, contrôle négatif) ou le vecteur surexprimant *YAP2* (p425GPD-*YAP2*) dans la souche BY4741. Les transformants ont poussé jusqu'à une  $DO_{600}$  de 1,0. Les protéines ont été extraites et les essais  $\beta$ -galactosidases ont été réalisés lors de trois expériences indépendantes sur deux clones pour chaque construction, chacun en duplicata. L'activité  $\beta$ -galactosidases est exprimée en unités d'*o*-nitrophénol formées/minute/mg de protéines utilisées. Les étoiles représentent les YRE atypiques identifiés et les X montrent les YRE mutés.

A)

-853  
 ACAAGATCGACCTAGATTCTCATAGACAAATCTTTGATGAAGAA **YRE5** TTAATCAAGCAAGAAGACGAAGAATAT  
 AGGGAACGTTTGAGGAACGGACCTTATTGGAAAAGGGTCGTTGCCTTCTGGTGTTAAAAAAAAAAGCATTTA  
 CTTCCTTTTATATTTATTCATTTTTGTACTTCTGTTTTGTAGTAATAGCATACGTGTAATGATAGACGATTTTCAT  
 TTTAATTCTAGTCCTTTATGAGCGAAGAAAAAATAAAAAGCACTAACGATTGCGTGATGGAAGTGGAGAG  
 GAAAATATAAGTGAAATAATATGAAGTGAGAGAAAAATGATTCCCTTTTGTCTTAATGCAACAGAAGAGGT  
 TTGATTTTCATCCGCATATGCAATTTTGCC **YRE4** TAGTAGGGGTGCAACCGTTTTTCGTCGTGCATCAGGAACGATCT  
 TCTTGCCTTTTTTAAAAATCTACGTTAAGAATTTTAAATTTTGTTAAGGTGTAATTAGCATTAGAA **YRE3** TGA  
 AGCATTTCAGTTTAACCAACTGTTCTGCGATATTTTACTTCTGAAATAACAATGTCTGCGAGT **YRE2** TTA **YRE1** TTA  
 TTAATCAATATTTGTCAATGCTCTTCCGAATAATTTTCAATTTGTCAGCTTTGCTCTGCGCTTTTCCTTAC  
 TGCAGACAATAAATGGCAAAGGAAAAAATAACAGTGTCATTTCAGATATGACACACTTTAACACCTGAGT  
 GGGTCATCACTACTTTGTGTTTGTCTCCACCCATGTTGTGATCGAAGAGAGATATAAAGGTTGATCATTTTG  
 GTTTTTTAAAGCTATATACACCATCAAAATCAAGAACACCAGACCTCCAAGCCAAAGAAATG

B)



En premier lieu, une forte activité  $\beta$ -galactosidase est détectée lorsque le promoteur pleine longueur est exprimé conjointement avec le vecteur surexprimant *YAP2* (fig. 10B). Sans la surexpression de *YAP2*, aucune activité n'est décelable, ce qui est consistant avec le fait que *FRM2* n'est pas exprimé de base et démontre également que l'activité  $\beta$ -galactosidase est causée par la surexpression de *YAP2* (fig. 7 et fig. 9). En plus, ce résultat montre bien que Yap2p régule l'expression de *FRM2* via sa région promotrice. Deuxièmement, une activité semblable à celle induite par le promoteur pleine longueur a été observée chez le transformant 4741/-433 *FRM2P/YAP2* $\uparrow$ , indiquant que les séquences situées entre les positions -853 et -433 ne sont pas requises à la régulation de *FRM2* par Yap2p. Ce résultat élimine les YRE4 et YRE5 comme sites de liaison potentiels pour Yap2p. Par la suite, une baisse d'activité (19%) du transformant 4741/-301 *FRM2P/YAP2* $\uparrow$  a été décelée, ce qui suggère la présence d'un élément de régulation entre les positions -433 et -301 dans le promoteur. Cependant, cet élément ne représenterait pas un élément majeur. Une chute drastique de l'activité  $\beta$ -galactosidase du transformant 4741/-258 *FRM2P/YAP2* $\uparrow$  par rapport au pleine longueur a été constatée. Cette baisse est de l'ordre de 93% et signifie qu'un ou des élément (s) important (s) de régulation du promoteur *FRM2* par Yap2p se situe entre les positions -301 et -258 pb. Cette section du promoteur contient deux YRE potentiels. Finalement, une légère baisse d'activité a été décelée chez le transformant 4741/-215 *FRM2P/YAP2* $\uparrow$  par rapport au transformant précédent, précisant que les séquences situées entre les positions -258 et -1 ont un rôle mineur dans la régulation de *FRM2* par Yap2p.

Pour déterminer l'importance de chacun des deux YRE potentiels situés entre les positions -301 et -258, la mutagenèse de ces YRE a été exécutée. Cet objectif a été atteint en modifiant quatre des 7 bases potentiellement importantes dans le YRE et en les remplaçant par CTAG. Cette modification a déjà été employée pour altérer des motifs d'ADN où les séquences régulatrices du promoteur *FLR1* par Yap1p ont été démontrées (103). La séquence du YRE1 TTATTAA a donc été modifiée pour TCTAGAA et nommée mutation 1 (mut.1) alors que la séquence du YRE2 TTAAGTG est devenue TCTAGTG et appelée mutation 2 (mut. 2). Une baisse d'activité de 28% a été mesurée chez le transformant 4741/-301 mut.2 *FRM2P/YAP2* $\uparrow$  comparativement à la souche sauvage 4741/-301 *FRM2P/YAP2* $\uparrow$ . Cependant, la chute la plus radicale a été observée chez le transformant 4741/-301 mut.1 *FRM2P/YAP2* $\uparrow$  où la baisse d'activité est de l'ordre de 94% comparativement à la souche sauvage 4741/-301 *FRM2P/YAP2* $\uparrow$ .



Ce résultat montre que le YRE1 TTATTAA est un élément de régulation indispensable de *FRM2* par Yap2p et que le YRE2 TTACTTG est aussi impliqué mais joue un rôle mineur. Par conséquent, la séquence TTATTAA représente une nouvelle séquence YRE pour une protéine Yap.

### 3.3.4 Étude de la liaison de Yap2p au promoteur *FRM2*

#### 3.3.4.1 Approche expérimentale

L'étude de la liaison de Yap2p au promoteur *FRM2* a été étudiée *in vivo*. Pour atteindre cet objectif, une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée (78). Le principe de cette expérience est l'immunoprécipitation d'un facteur de transcription lié au promoteur de ses cibles transcriptionnelles. Premièrement, un épitope doit être intégré en amont ou en aval du CLO du facteur de transcription à tester, ce qui permettra l'immunoprécipitation. Par la suite, les cellules contenant ou non un épitope sont cultivées dans les conditions favorisant l'induction de l'expression des cibles du facteur de transcription. Ces conditions sous-entendent donc que le facteur de transcription devra se lier au promoteur de ses cibles afin d'activer leur transcription. Les complexes ADN-protéines sont fixés à l'aide du formaldéhyde et liés à des billes, qui sont elles-même liées à des IgG. Les cellules sont brisées par lyse et la chromatine est fragmentée par sonication. Les complexes composés de 300 à 400 pb d'ADN liés au facteur de transcription-billes-IgG sont immunoprécipités par l'anticorps correspondant à l'épitope du facteur de transcription. Ces complexes sont par la suite lavés et le pontage est éliminé à l'aide du SDS. L'ARN et les protéines sont dégradés par la Rnase et la protéinase K et l'ADN est récupéré. Finalement, des réactions de PCR sont réalisées en utilisant des oligonucléotides s'hybridant à une section du promoteur testé. Une deuxième paire d'oligonucléotides est utilisée, correspondant à une partie d'un promoteur contrôle prédit comme n'étant pas sous le contrôle de notre facteur de transcription.

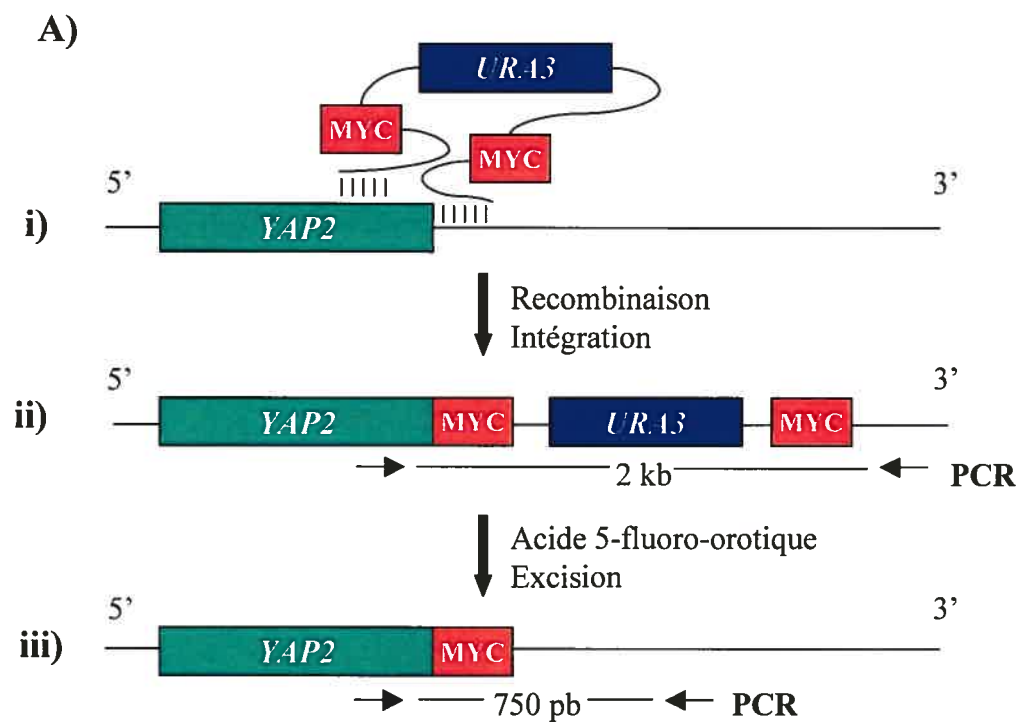
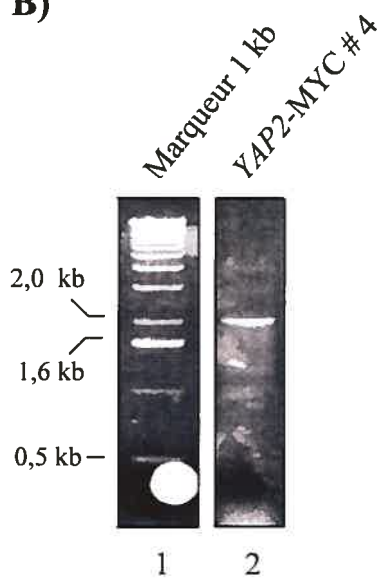
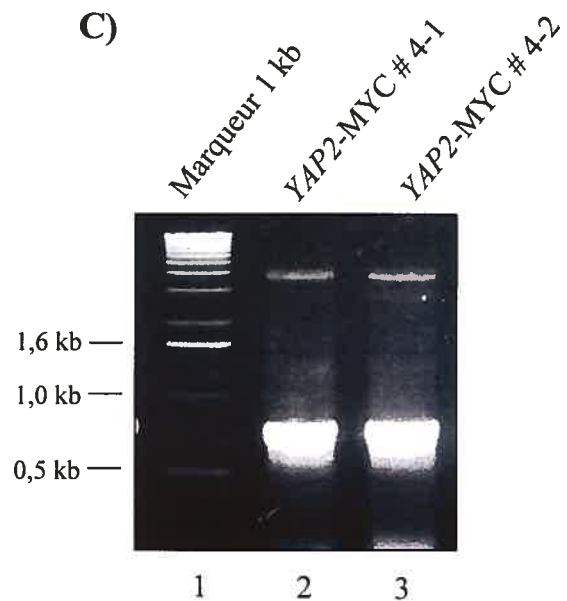
### 3.3.4.2 Construction et caractérisation de la souche *YAP2-MYC*

Afin d'effectuer des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine, un épitope *MYC* a été intégré au niveau de la région C-terminale du gène *YAP2* endogène. Le vecteur pMPY-3xMYC a servi à la construction d'une cassette contenant des séquences provenant de la région C-terminale et 3' non transcrite du gène *YAP2* et permettant la recombinaison au locus *YAP2*. La sélection des intégrants a été faite grâce au marqueur *URA3* ((121), fig. 11A i). L'ADN des recombinants a été extrait et l'exactitude de l'intégration au locus a été vérifiée par PCR (fig. 11A ii, voir section 2.7). Un oligonucléotide se lie à une région C-terminale de *YAP2* et l'autre à la région non-codante 3' (Table 3). Comme la cassette mesure environ 1,2 kb, un transformant ayant intégré la cassette au bon endroit présentera un fragment de PCR d'environ 2 kb (fig. 11B). Trois des huit clones testés avaient bien intégré la cassette, incluant le clone *YAP2-MYC* # 4. Par la suite, le marqueur de sélection ainsi que la deuxième étiquette *MYC* ont été excisés à l'aide de l'acide 5-fluoro-orotique (fig. 11A iii). Encore une fois, l'ADN des transformants a été extrait et l'exactitude de l'excision a été vérifiée par PCR. Un transformant ayant excisé le marqueur et l'étiquette correctement produira un fragment de PCR d'environ 750 pb (fig. 11C). Les deux transformants testés avaient bien excisé la cassette.

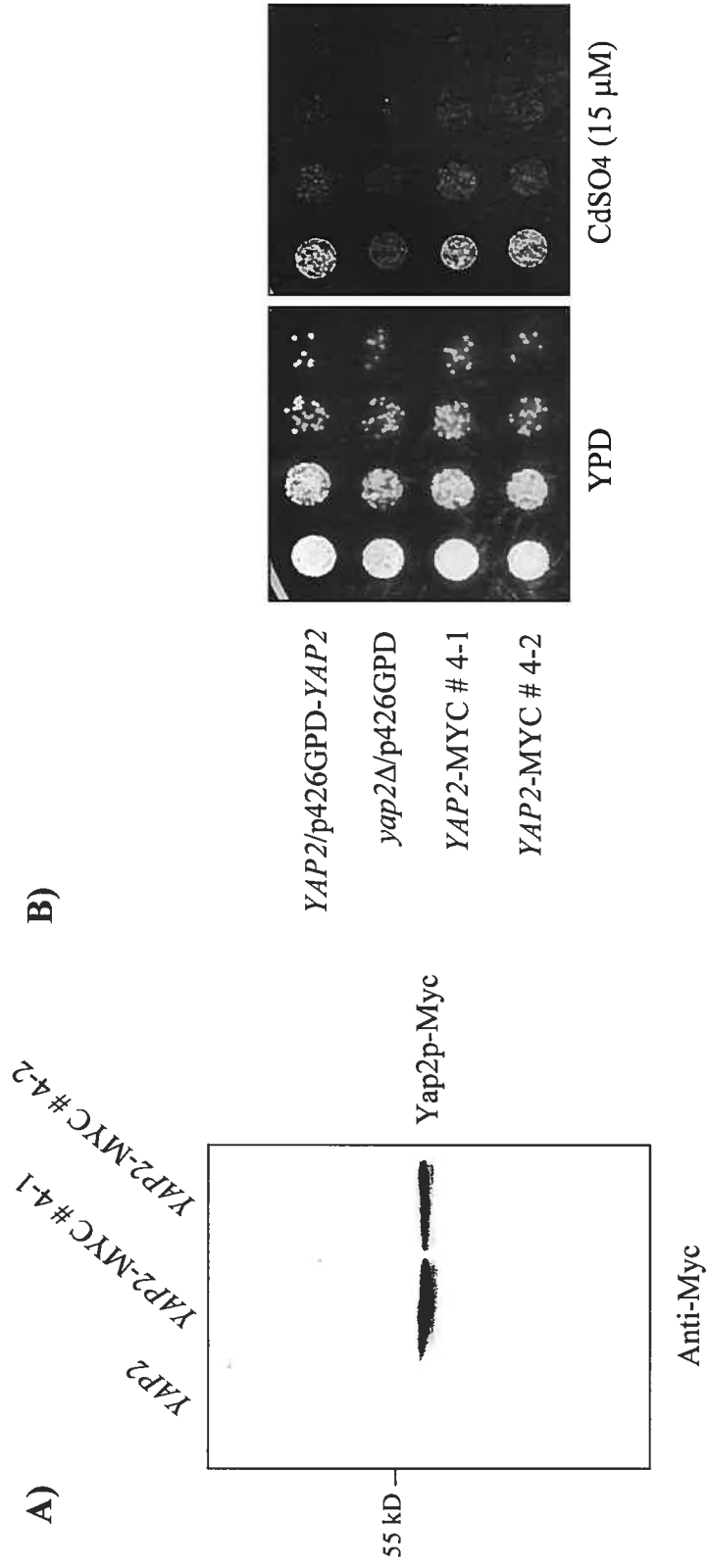
La caractérisation des deux clones ayant bien excisé la cassette a débuté par une analyse Western blot afin de vérifier si la protéine de fusion Yap2p-Myc était bien exprimée. Pour ce faire, les cellules ont été cultivées toute la nuit et les protéines totales ont été extraites par la méthode des billes de verre (voir section 2.7.1). 24 µl d'extraits protéiques ont été migrés sur un gel SDS-PAGE. Les protéines ont été transférées sur une membrane Bio-Rad et celle-ci a été incubée dans une solution d'hybridation TBS-T contenant une dilution 1/300 de l'anticorps MYC 9E10 (Santa Cruz Biotech) et la révélation a été effectuée par l'ECL-Plus (Qiagen). De fait, une protéine d'environ 53 kD a été décelée chez les deux clones ayant bien excisés le marqueur et une étiquette, poids moléculaire prédit de la protéine Yap2p-Myc ((410 acides aminés Yap2p + 35 acides aminés Myc) \* 118.9 Da = 53 kDA, fig. 12A). Par la suite, la capacité de ces deux clones à résister au cadmium a été examinée. De cette manière, on vérifiait si l'épitope Myc influençait la fonction de Yap2p. La souche contrôle *yap2Δ/p426GPD* est sensible au cadmium comparativement à la souche *YAP2-p426GPD-YAP2*, signifiant que le test est fonctionnel (fig.

**Fig. 11 Description des étapes ayant servi à la construction de la souche *YAP2-MYC*.**

A) Schématisation de l'intégration d'une étiquette *MYC* au locus *YAP2*. i) Une cassette contenant le marqueur de sélection *URA3*, deux étiquettes *MYC* et des séquences provenant du locus *YAP2*, a été utilisée pour la construction de la souche *YAP2-MYC*. Les barres verticales représentent un événement de recombinaison. ii) L'intégration par recombinaison de cette cassette a été vérifiée par PCR où un fragment de 2 kb était obtenu si l'intégration était juste. iii) La présence d'acide 5-fluoro-orotique dans le milieu de croissance permet de sélectionner l'excision du marqueur *URA3* et du deuxième *MYC*. Un fragment de 750 pb était obtenu par PCR si l'excision s'était bien effectuée. → : représente l'emplacement des oligonucléotides utilisés pour les réactions de PCR. B) Confirmation de l'intégration par PCR. Ligne 1 : marqueur de poids moléculaire 1 kb; ligne 2 : le clone *YAP2-MYC* # 4 ayant intégré la cassette au locus *YAP2* produit un fragment de 2 kb. C) Confirmation de l'excision par PCR. Ligne 1 : marqueur de poids moléculaire 1 kb; lignes 2 et 3 : les clones *YAP2-MYC* # 4-1 et *YAP2-MYC* # 4-2 ont bien excisé la cassette et produisent un fragment de 750 pb.

**B)****C)**

**Fig. 12 Caractérisation des souches *YAP2-MYC* # 4-1 et *YAP2-MYC* # 4-2.** A) Reconnaissance de l'étiquette Myc. Les transformants ont poussé toute la nuit et les protéines totales ont été extraites. Une analyse de type Western blot a été réalisée à l'aide d'un anticorps anti-Myc. Une protéine d'environ 53 kD a été détectée, tel qu'attendu. kD : kiloDalton B) Test de résistance au cadmium. Les transformants ont poussé toute la nuit et ont été resuspendus à une  $DO_{600}$  de 0,1. Trois microlitres de dilutions successives un cinquième ont été déposés sur des pétris ne contenant pas d'oxydant (YPD) ou contenant du sulfate de cadmium ( $CdSO_4$ ).



12B). Les souches *YAP2-MYC* # 4-1 et *YAP2-MYC* # 4-2 ont une croissance plus importante que celle de la souche *yap2Δ/p426GPD*, montrant que l'étiquette Myc n'affecte pas la fonction de Yap2p. Ces souches peuvent donc être utilisées pour des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine.

#### 3.3.4.3 Liaison de Yap2p au promoteur *FRM2* in vivo

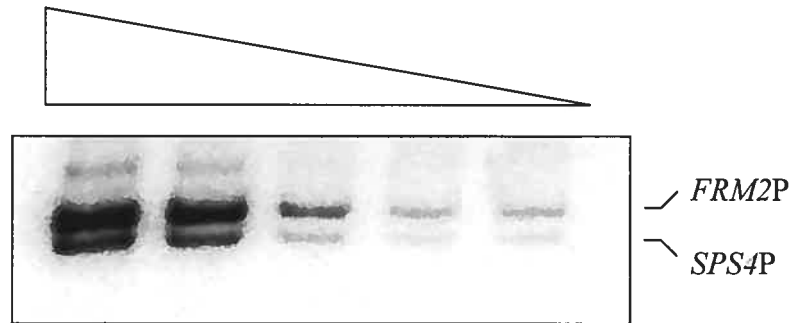
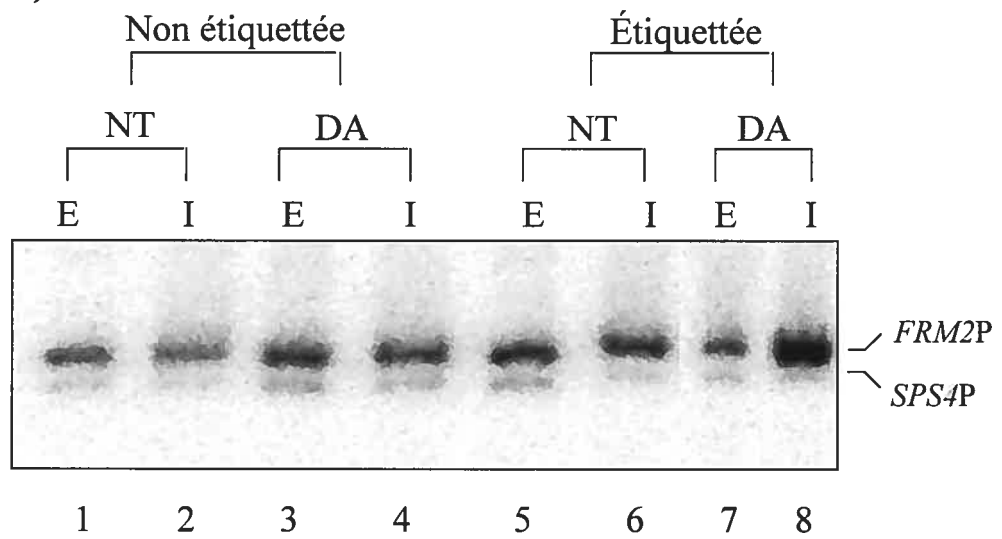
Les souches sauvage non étiquetée et étiquetée *YAP2-MYC* # 4-1 ont été traitées ou non au diamide 2,5 mM pendant 1 heure et l'immunoprécipitation de la chromatine a été faite par un anticorps Myc, tel que décrit à la section 2.8. Tout d'abord, le niveau de saturation des réactifs a été évalué par un premier PCR. Pour ce faire, l'ADN purifié à partir de l'extrait cellulaire total provenant de la souche étiquetée et traitée au diamide a été dilué 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:120 et utilisé comme gabarit. Deux paires d'oligonucléotides ont été utilisées. La première paire s'hybride à une section du promoteur du gène *SPS4* et fournit un fragment contrôle de 203 pb (Table 3). Ce promoteur a été choisi car il ne devrait pas être immunoprécipité par Yap2p-Myc. La deuxième paire se lie à une partie du promoteur *FRM2* et produit un fragment de 217 pb. Ce fragment contient les deux YRE décrits à la section 3.3.3. Bref, ce PCR a permis de noter un enrichissement préférentiel de ces deux bandes et ce, proportionnellement à l'augmentation de la quantité d'extraits cellulaires totaux (fig. 13A). Cette observation montre que la réaction de PCR n'est pas saturée et que les réactifs sont en quantités suffisantes. Cela signifie également que les résultats de l'immunoprécipitation de la chromatine observés plus tard seront à leur pleine potentialité, c'est-à-dire qu'ils pourront être quantifiés.

Pour la deuxième série de PCR, tous les extraits cellulaires totaux ont été dilués à la dilution 1:40, qui permet de bien évaluer la quantité de la bande contrôle et 1 µl de cette dilution a été employé pour le PCR. Enfin, 2 µl de l'ADN immunoprécipité ont été utilisés pour le PCR. La souche sans épitope sert de mesure de bruit de fond de l'expérience et ne montre aucun enrichissement de la bande représentant le promoteur *FRM2* pour une quantité équivalente de la bande contrôle représentant le promoteur *SPS4* (fig. 13B, lignes 1 à 4). Dans la souche étiquetée mais non traitée au diamide, un faible enrichissement (environ deux fois) de la bande de 217 pb a été observé par rapport à une quantité équivalente de bande contrôle, suggérant que Yap2p n'est

**Fig. 13 Immunoprécipitation du promoteur *FRM2* par Yap2p-Myc.**

Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont été réalisées à l'aide des souches sauvages et étiquetées *YAP2-MYC* traitées ou non au diamide 2,5 mM pendant 1 heure. A) Des réactions de PCR ont été réalisées avec des quantités décroissantes d'extrait cellulaire total de la souche étiquetée et traitée au diamide, en utilisant des oligonucléotides spécifiques pour le promoteur *FRM2* (*FRM2P*) et *SPS4* (*SPS4P*, contrôle). B) Des réactions de PCR ont été réalisées avec 2 µl d'ADN immunoprécipité ou d'une dilution 1 :40 des extraits cellulaires totaux en utilisant les même oligonucléotides que ceux décrit en A). NT : non traité, DA : traitement au diamide, E : extrait cellulaire total, I : ADN immunoprécipité.



**A)**Extrait cellulaire total de la souche *YAP2-Myc* traitée**B)**

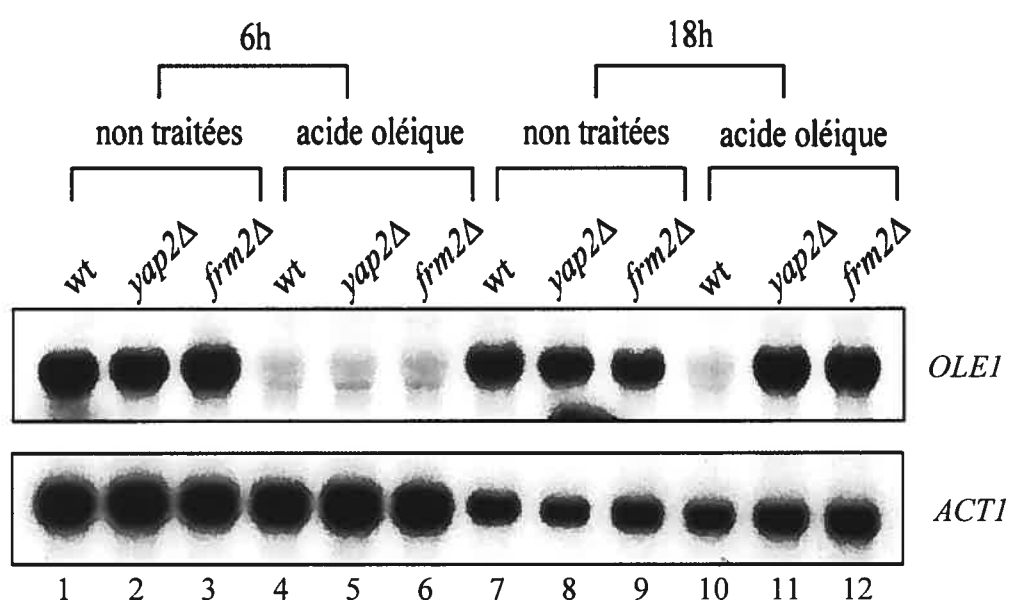
liée que faiblement au promoteur *FRM2* sans stress oxydatif (fig. 13B. lignes 5 et 6). Cependant, un enrichissement de presque six fois de la bande représentant la section du promoteur *FRM2* dans la souche étiquetée et traitée au diamide a été noté, démontrant que Yap2p régule *FRM2* en réponse au diamide par sa région promotrice et ce, *in vivo* (fig. 13B. lignes 7 et 8). En somme, ces résultats démontrent que la présence de diamide provoque la liaison de Yap2p au promoteur *FRM2 in vivo*.

### 3.4 Effet de l'acide oléique sur la régulation de Frm2p et Yap2p sur le gène *OLE1*

Tel que mentionné précédemment, *FRM2* a été identifié par une mutation dans sa séquence nucléotidique qui permet l'expression du promoteur *OLE1* fusionné au gène *LacZ* et ce, en présence d'acide gras (87). Ole1p est une protéine essentielle qui agit en tant que désaturase d'acide gras  $\Delta$ -9. La transcription d'*OLE1* est réprimée entre autre par la présence d'acide gras insaturé tel l'acide oléique. Ce dernier est un acide gras insaturé en position 9 et sa désaturation s'effectue par l'action d'Ole1p (86). Afin de déterminer si Yap2p joue un rôle dans la régulation de l'expression d'*OLE1*, une analyse par Northern des souches sauvages, *frm2Δ* et *yap2Δ* traitées ou non avec de l'acide oléique 0,2% pendant 6 heures ou 18 heures a été exécutée (fig.14). D'après ce qui est connu, des cellules *frm2Δ* traitées à l'acide oléique ne devraient pas être en mesure de réprimer la transcription d'*OLE1* (87). Les cellules non traitées (lignes 1, 2, 3 et 7, 8, 9) répondent tel qu'attendu, c'est-à-dire que le transcrit *OLE1* est fortement exprimé dans les trois souches puisque la présence de la protéine est essentielle à la désaturation des acides gras saturés. Lorsque les cellules sont traitées pendant 6 heures à l'acide oléique, l'expression d'*OLE1* est presque nulle dans les trois souches comparativement à celle observée dans les souches non traitées (comparer lignes 4, 5, 6 aux lignes 1, 2, 3). Ce résultat confirme que le traitement à l'acide oléique imposé fonctionne puisqu'il bloque l'expression d'*OLE1*.

Par contre, lors du traitement de 18 heures, les phénotypes obtenus diffèrent entre les souches. Dans la souche sauvage traitée pendant 18 heures, l'expression d'*OLE1* est réprimée, tel qu'attendu (comparer ligne 10 à la ligne 7). Cependant, chez les souches *frm2Δ* et *yap2Δ*, un traitement à l'acide oléique de 18 heures a pour effet de permettre l'expression d'*OLE1* à un

**Fig. 14 Analyse par Northern blot de la régulation du gène *OLE1* par *FRM2* et *YAP2* suite à un traitement à l'acide oléique.** Les souches sauvage, *frm2Δ* et *yap2Δ* ont poussé jusqu'à une  $DO_{600}$  de 1,0 et ont été traitées avec de l'acide oléique 0,2% pendant 6 heures ou 18 heures. L'ARN total a été extrait et 20  $\mu$ g ont été analysés par Northern blot avec une sonde *OLE1*-P<sup>32</sup>. Le niveau de l'ARNm de l'*ACT1* est inclus comme contrôle de la quantité des ARN.



niveau équivalent à celui des cellules non traitées (comparer ligne 11 à la ligne 8 et la ligne 12 à la ligne 9). En ce qui concerne la souche *frm2Δ*, le résultat reflète le phénotype connu et confirme l'implication de *FRM2* dans la voie de signalisation des acides gras (87). Pour ce qui est du phénotype observé chez la souche *yap2Δ*, ce résultat suggère une implication de Yap2p dans la régulation d'*OLE1*, possiblement via sa régulation de *FRM2*. Le fait que la dérèpression de l'expression d'*OLE1* dans les souches *frm2Δ* et *yap2Δ* ait lieu après 18 heures de traitement et non 6 heures suggère que cette régulation n'est pas directe ou demande la transcription et la traduction des protéines impliquées dans la régulation (voir discussion, section 4.2.4).

## **CHAPITRE 4 : DISCUSSION**

### **4.1 Identification et caractérisation du régulon Yap2p**

#### *4.1.1 Identification de tous les gènes répondant à la surexpression de YAP2 biopuces*

##### 4.1.1.1 Choix de l'approche expérimentale

Il était connu depuis une dizaine d'années que la surexpression de *YAP2* confère la résistance au cadmium et au 1,10-phénantroline, indiquant que ce facteur de transcription est important dans la réponse au stress oxydatif (11;53). Cependant, les cibles responsables de ces phénotypes n'étaient pas identifiées. Nous avons entrepris de répondre à cette question en choisissant la technologie des biopuces qui permet d'observer les variations d'expression de l'ensemble du génome en réponse à différentes conditions expérimentales (exemple : la surexpression ou la délétion d'un régulateur, exposition des cellules à un stress ou à des agents toxiques etc). Une approche de biopuces a déjà été employée pour *YAP1*, le plus proche homologue de *YAP2*, afin de prédire ses cibles, et ce, en utilisant un vecteur multicopies surexprimant *YAP1* (30). Tel que mentionné précédemment, Yap1p s'accumule au noyau en réponse au stress oxydatif, lui permettant d'activer ses cibles transcriptionnelles. Cette accumulation est due à l'incapacité de l'exportine Crm1p à se lier à Yap1p oxydée et à l'exporter du noyau au cytoplasme (voir section 1.4.2.3). Les séquences responsables de cette accumulation sont situées dans la région C-terminale de Yap1p, plus précisément dans les deux CRD (fig.3). La surexpression de Yap1p a pour effet de reproduire une réponse au stress oxydatif. En effet, en condition de surexpression, une très grande quantité de protéines Yap1p est présente dans le noyau. L'export fait par Crm1p est insuffisant par rapport à la quantité de protéines à exporter, causant ainsi l'accumulation du facteur au noyau. Plusieurs gènes découverts par biopuces suite à la surexpression de *YAP1* se sont révélés des cibles transcriptionnelles de Yap1p *in vivo* (30).

Un alignement de séquences montre que le domaine régulant la localisation nucléaire de Yap1p au noyau est très homologue avec la région correspondante chez Yap2p (fig. 15). De plus, les cystéines responsables de l'accumulation nucléaire de Yap1p en réponse à certains oxydants

**Fig. 15 Alignement de séquences protéiques du C-CRD de Yap1p et Yap2p.** Les séquences ont été transférées dans le programme Emboss afin de procéder à l'alignement. Les barres verticales représentent les acides aminés identiques. Les acides aminés en rouge indiquent la séquence d'export nucléaire.

Yap2p	356	CYHILEEISSLPKYS	SLD	DDLCSELI	IKAKCTDDCKI	VVKARDLQ	SALVRQ	378	387
Yap1p	598	CSEIWDRI	TTHPKYS	DI	DVDGLCSELM	AKAKCSER	-GVVINAEDVQ	LALNKH	620
									629



tels le diamide et le cadmium sont conservées chez Yap2p. Nous avons donc émis l'hypothèse que Yap2p pourrait être régulée de la même façon que Yap1p en réponse à un stress oxydatif. Nous avons choisi d'utiliser une approche semblable à *YAP1*, en surexprimant *YAP2*.

Pour y arriver, la souche sauvage BY4741 a été transformée avec le vecteur p426GPD ou p426GPD-*YAP2* qui surexprime *YAP2* de façon constitutive. Les résultats obtenus sont donc l'effet de la surexpression de *YAP2* sur l'expression des gènes. La souche BY4741 a été sélectionnée car le projet de délétion systématique de tous les gènes a été réalisé dans cette souche, ce qui permet d'effectuer des études fonctionnelles rapidement. De plus, elle est une proche parente de la souche ayant servi au séquençage du génome de *S. cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org>). Toutefois, il est important de noter que les résultats obtenus par l'approche des biopuces sont la conséquence d'une surexpression forcée de la protéine Yap2p et qu'ils ne représentent peut-être pas parfaitement la réalité. Par exemple, il se peut qu'une trop grande quantité de Yap2p dans le noyau entraîne sa liaison à des promoteurs de manière peu ou pas spécifique. Dans ce cas, les gènes identifiés ne seraient pas des cibles transcriptionnelles de Yap2p *in vivo*. Aussi, tel que mentionné précédemment, le stress oxydatif entraîne des modifications post-traductionnelles de la protéine Yap1p (75). Une surexpression forcée n'entraîne pas ces modifications, ce qui peut donc influencer les résultats. Finalement, une surexpression constitutive peut entraîner la régulation de cibles secondaires qui seraient le résultat d'une adaptation de la cellule. Une approche alternative palliant à ce problème aurait été de cloner ce gène sous le contrôle d'un promoteur inductible tel le promoteur du gène *GAL10*. De cette manière, notre facteur de transcription serait exprimé fortement que pour une courte période de temps et la cellule n'aurait pas à s'adapter à une quantité massive du facteur. Néanmoins, plusieurs évidences suggèrent que les gènes trouvés sont des cibles de Yap2p. Premièrement, les gènes obtenus peuvent être regroupés en catégories fonctionnelles, la plupart impliquées dans la réponse au stress oxydatif, ce qui est en accord avec la fonction prédite de Yap2p dans la cellule. De plus, j'ai montré que l'expression d'un des gènes identifiés par les biopuces, *FRM2*, est induite en réponse à un traitement au diamide et cette induction est fortement dépendante de la présence de *YAP2*, ce qui montre bien que Yap2p régule *FRM2 in vivo* (fig. 9). Il y a donc fort à parier que les autres gènes identifiés par les biopuces sont également des cibles véritables de Yap2p.

#### 4.1.1.2 Implication de Yap2p dans la résistance au diamide

Les souches utilisées pour les biopuces ont également servi à effectuer des tests de résistance aux oxydants. En plus de confirmer les phénotypes de résistance connus pour Yap2p, ces tests m'ont permis de montrer que la surexpression de *YAP2* confère également la résistance à un autre agent oxydant, soit le diamide (fig. 5). Ce résultat allonge la liste des agents oxydants auxquels la surexpression de *YAP2* confère la résistance et laisse supposer un rôle encore plus important de Yap2p dans la réponse au stress oxydatif chez la levure. Après l'analyse de ce résultat, il est apparent que si la surexpression de *YAP2* provoque la résistance à un oxydant, sa délétion n'entraînera pas nécessairement un phénotype d'hypersensibilité à ce même oxydant. En effet, la surexpression de *YAP2* confère la résistance au diamide alors que sa délétion ne cause pas l'hypersensibilité à cet oxydant, comparativement à la souche sauvage. On peut donc penser que les effecteurs responsables de cette résistance ne sont pas exprimés à un niveau de base. Cela expliquerait pourquoi l'absence de Yap2p ne cause pas l'hypersensibilité au diamide. Une forte induction de l'expression de ces effecteurs, causée par la surexpression de *YAP2*, est nécessaire pour observer leur effet. Dans le cas du cadmium et du 1,10-phénantroline, une souche *yap2Δ* est hypersensible alors qu'une souche surexprimant *YAP2* amène la résistance. Le ou les gènes responsables de ces phénotypes sont exprimés de base et sous le contrôle de Yap2p. Il se peut aussi que les cibles de Yap2p conférant l'hypersensibilité et la résistance à un oxydant ne soient pas nécessairement les mêmes.

Par ailleurs, la résistance au diamide et au cadmium causée par la surexpression de *YAP2* peut ne pas être surprenante. On sait déjà que deux centres de réduction différents contrôlent l'activité de Yap1p en réponse à un traitement au  $H_2O_2$  et au diamide (5;140). En effet, les cystéines 598, 620 et 629 de Yap1p sont oxydées par les agents réagissant avec les groupements thiols, comme le diamide et le cadmium alors que les cystéines 303 et 598 sont impliquées dans la régulation de Yap1p par le  $H_2O_2$  (5;136). Un alignement de séquences du C-CRD de Yap1p et Yap2p montre que les cystéines 598, 620 et 629 de Yap1p ont leurs homologues chez Yap2p (fig. 15 et (75)). De plus, un alignement de séquence du N-CRD de Yap1p et Yap2p démontre que la cystéine 303 n'est pas conservée chez Yap2p (résultat non présenté). Comme Yap2p confère la résistance au diamide et au cadmium et non au  $H_2O_2$ , il est possible que Yap2p possède un seul centre de réduction actif et soit par conséquent spécialisée dans la réponse au stress oxydatif

causée par des oxydants réagissant avec les groupements thiols. Il serait intéressant de muter les cystéines de Yap2p afin de vérifier si elles affectent la fonction de Yap2p dans la résistance au diamide et au cadmium.

#### 4.1.1.3 Classification fonctionnelles des cibles potentielles de Yap2p

Les expériences des biopuces nous ont fourni une liste de gènes considérés comme des cibles transcriptionnelles potentielles de Yap2p, comprenant les effecteurs des phénotypes de résistance et d'hypersensibilité connus pour Yap2p (Table 4). Ces expériences ont aussi permis de postuler de nouveaux rôles pour Yap2p dans la cellule. L'expression de quelques-uns de ces gènes, suite à la surexpression de *YAP2*, a été confirmée par analyse de type Northern (fig. 7). Il est important de noter que les gènes trouvés par l'expérience des biopuces peuvent être considérés comme des cibles transcriptionnelles de Yap2p mais que ces résultats restent à être validés.

##### a) Les transporteurs

Plusieurs gènes codant pour des transporteurs impliqués dans la résistance à différents composés toxiques ont été identifiés par les biopuces (Table 4). *FLR1*, un gène codant pour un transporteur de type facilitateur, est de ce nombre. La surexpression de Flr1p cause la résistance au fluconazole, au cycloheximide, au 4-NQO, à la cérulénine et au benomyle (1;107;131). Un deuxième gène codant pour un transporteur de type facilitateur, Atr1p, est aussi régulé par Yap2p. Cette protéine est responsable de la résistance au 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) et au 4-NQO (24). L'expression du gène encodant le transporteur ABC Ycf1p répond aussi à la surexpression de Yap2p. Ce transporteur de métaux a pour fonction de concentrer le glutathion et le glutathion conjugué à des métaux dans la vacuole (33). Il joue un rôle primordial dans la résistance au cadmium (41;141). De plus, Flr1p et Ycf1p participent conjointement à la résistance à la diazaborine (143;139).

*ARR3*, un autre gène dont l'expression est modulée par Yap2p, code pour un transporteur de type facilitateur. Arr3p exporte l'arsenite à l'extérieur de la cellule (154). De manière

intéressante, nos résultats montrent que l'expression du gène codant pour la réductase d'arsenate Arr2p est également régulée par Yap2p. Il est connu que l'arsenate pénétrant dans la cellule est réduit en arsenite par Arr2p et exporté hors de la cellule par Arr3p (96). Arr3p confère la résistance à l'arsenite alors que Arr2p participe à la résistance à l'arsenate. De plus, l'arsenite peut modifier l'état de réduction de la cellule en se liant au glutathion. En effet, l'arsenite crée indirectement des conditions de stress oxydatif en causant l'accumulation de ÉOR (19:45). Il se peut donc que Yap2p ait une fonction importante dans la détoxification de l'arsenate. Il serait particulièrement intéressant de vérifier si la surexpression de *YAP2* confère la résistance à l'arsenite et l'arsenate. Si tel est le cas, il faudrait étudier si la surexpression de *YAP2* dans les souches *arr2Δ* ou *arr3Δ* entraîne une résistance à l'arsenite et l'arsenate par rapport à une souche contrôle sauvage surexprimant *YAP2*. Si, dans les souches *arr2Δ* ou *arr3Δ* surexprimant *YAP2*, le niveau de croissance est inférieur par rapport au contrôle, cela signifierait que *ARR2* et *ARR3* sont des effecteurs de Yap2p dans la résistance à l'arsenite et à l'arsenate. De plus, il a déjà été démontré que l'expression d'*ARR2* et *ARR3* est induite par l'arsenite (155). Par analyse Northern, il faudrait aussi analyser le rôle de Yap2p dans l'induction de l'expression d'*ARR2* et *ARR3* en présence ou non d'arsenite et d'arsenate et ce, dans les souches sauvages, *yap2Δ*, *yap8Δ* et *yap2Δyap8Δ*. Cette expérience nous permettrait de déterminer la fonction respective de Yap2p et Yap8p dans ce processus.

Par ailleurs, Ycf1p et Arr3p confèrent toutes les deux la résistance à l'arsenite mais en utilisant deux mécanismes indépendants. En effet, Arr3p est une protéine membranaire qui transporte les anions arsenite à l'extérieur de la cellule à l'aide du potentiel membranaire alors que Ycf1p est une pompe vacuolaire couplée à l'ATP qui séquestre l'arsenite conjugué au glutathion dans la vacuole (116). L'expression d'*ARR3* est régulée par Yap8p alors que celle de *YCF1* est induite par Yap1p (155). Il se peut donc que Yap2p régule l'expression de ces deux gènes, de concert avec Yap8p et Yap1p. Ainsi, en régulant plusieurs types de transporteurs, Yap2p participe à la réponse au stress oxydatif par différentes avenues. De plus, nos résultats suggèrent que Yap2p joue un rôle dans la résistance à plusieurs composés ayant des propriétés antifongiques et est impliquée dans la détoxification des cellules.

## b) Les déshydrogénases

*S. cerevisiae* contient une famille de déshydrogénases d'aryl-alcool (AAD) contenant sept membres (28). De façon intéressante, Yap2p régule six de ces sept membres (Table 4). La séquence des gènes *AAD* est très homologue, suggérant que ces gènes codent pour des protéines ayant des fonctions redondantes. Normalement, les déshydrogénases d'aryl-alcool agissent en dégradant la lignine. Cependant, *S. cerevisiae* ne possède pas cette activité. Il semblerait plutôt que les protéines Aadp convertissent les aldéhydes aromatiques en leurs alcools correspondants chez *S. cerevisiae* (28). De plus, les protéines Aadp présentent une homologie de séquence en acides aminés avec des oxydoréductases fongiques et bactériennes, suggérant que les Aadp jouent un rôle dans la réponse au stress oxydatif. Il a aussi été démontré que l'expression de ces gènes est régulée par Yap1p en réponse au stress oxydatif (29). Deux gènes codant pour des déshydrogénases de NAD(P)H, *OYE2* et *OYE3*, sont également régulés par Yap2p. Les protéines correspondantes pourraient aussi agir en tant qu'oxydoréductases de NAD(P)H (104). Nos résultats montrent donc que Yap2p régule un ensemble d'oxydoréductases impliquées dans différentes voies métaboliques.

## c) La voie du glutathion et de la thiorédoxine

Les expériences de puces à ADN ont également montré que Yap2p régule l'expression de deux gènes impliqués dans la voie du glutathion : *GTT2*, codant pour une transférase de glutathion et *GPX2*, encodant une peroxydase de glutathion (Table 4) (22;59). Tel que mentionné précédemment, la voie du glutathion joue un rôle important dans la réponse au stress oxydatif (voir section 1.3.2.1). Cette réponse s'effectue en trois étapes : 1) les toxines sont activées par l'oxydation, la réduction ou l'hydrolyse pour permettre l'attachement d'un groupement fonctionnel; 2) la transférase conjugue une molécule de glutathion au nouveau groupement fonctionnel des toxines présentes; 3) le conjugué glutathion-toxine est exporté dans la vacuole par une pompe présente dans la membrane plasmique (60). Gtt2p agit donc au deuxième stage de détoxification et il est également bien documenté qu'une des pompes transportant le glutathion conjugué est Ycf1p, autre cible de Yap2p (84;140). Gpx2p, quant à elle, agirait comme une peroxydase de glutathion conjuguée aux phospholipides hydroperoxydes (PGPH). Cette dernière

réduit les lipides hydroperoxydes estérifiés des membranes. Ces lipides sont des intermédiaires centraux dans la chaîne de peroxydation des lipides. De plus, les PGPH sont les seules enzymes capables de réparer les dommages causés par la peroxydation des lipides et elles sont généralement considérées comme la ligne de défense majeure contre les dommages aux membranes causés par l'oxydation (4). Enfin, l'expérience des biopuces a montré que la surexpression de *YAP2* induit l'expression de *TRR1*, codant pour une réductase de thiorédoxine, suggérant que Yap2p pourrait également jouer un rôle dans cette voie (92). Nos résultats suggèrent que Yap2p est impliquée dans la réponse au stress oxydatif via la voie du glutathion et de la thiorédoxine, en régulant l'expression de transporteurs et d'enzymes jouant un rôle dans ces voies.

#### d) L'acquisition du fer

Un nombre important de gènes jouant un rôle dans l'acquisition du fer par la cellule sont induits par la surexpression de Yap2p (Table 4). Chez *S. cerevisiae*, le fer libre est transporté à l'intérieur de la cellule par deux systèmes de transport, un de haute et l'autre de basse affinité (79). Le système de haute affinité comprend la ferroxidase Fet3p. Une activité réductase est également requise à la surface de la cellule pour permettre le transport du fer. La majorité de cette activité est fournie par les deux flavocytochromes, Fre1p et Fre2p, qui réduisent l'ion ferrique en ion ferreux, substrat du système de transport de haute affinité. *S. cerevisiae* peut aussi acquérir le fer par les sidérophores, de petites molécules organiques de bas poids moléculaires (79). Par exemple, la ferrioxamine A, le ferrochrome triacétylfusarinine C et la ferricrocine sont des molécules sidérophores (79). Le transport des sidérophores est considéré comme le système de basse affinité. *S. cerevisiae* n'est pas en mesure de synthétiser ses propres sidérophores mais est capable d'utiliser ceux produits par les autres microorganismes présents dans son environnement. Une famille de transporteurs (Arn1p à Arn4p) fait la navette entre la surface de la cellule et les compartiments endosomaux, contrôlant ainsi le transport des sidérophores. Une alternative à ce transport est la réduction des sidérophores. L'ion sidérophore est réduit à la surface de la cellule par des réductases de fer et de cuivre (Fre1p à Fre4p) qui fournissent ainsi un ion ferreux pour le système de transport de haute affinité. Finalement, un groupe de

mannoprotéines (Fit1p, Fit2p et Fit3p) facilite le transport des sidérophores en séquestrant cet ion dans la membrane cellulaire (118).

Parmi toutes les protéines mentionnées, six ont été identifiées par l'expérience des biopuces. Il s'agit de Fet3p, Fre1p, Arn3p, Arn4p, Fit2p et Fit3p. Ces résultats suggèrent fortement que Yap2p est impliquée dans le transport du fer à l'intérieur de la cellule et ce, dans les systèmes de transport de haute et de basse affinité utilisés par *S. cerevisiae*. De plus, ces résultats demeurent consistants avec le rôle de Yap2p dans la réponse au stress oxydatif puisqu'on sait qu'une activité incontrôlée de réduction du fer et du cuivre peut amener à la formation de radicaux oxygénés. Ce serait la première fois qu'on observerait qu'un facteur de transcription bZIP est impliqué dans la régulation de gènes impliqués dans le transport du fer. Par ailleurs, il est connu que ces gènes sont sous le contrôle des facteurs de transcription Aft1p et Aft2p, qui activent leur expression en absence de fer (79). Il se peut donc que Yap2p régule l'expression de ces gènes de concert avec Aft1p et Aft2p. Par conséquent, il serait intéressant de vérifier si l'induction de ces gènes en absence de fer nécessite la présence de Yap2p. Pour ce faire, les souches sauvages et *yap2Δ* pourront être traitées ou non avec un chélateur de fer (tel le bathophénantrolinedisulfonic, BPS) et une analyse Northern pourra être réalisée. Si l'expression de ces gènes diminue dans la souche *yap2Δ* traitée au chélateur par rapport à la souche sauvage traitée, cela suggère que Yap2p joue un rôle dans le transport du fer via la régulation de l'expression de ces gènes. On peut également émettre l'hypothèse que la résistance au cadmium conférée par Yap2p, de concert avec la pompe Ycf1p, pourrait impliquer les gènes participant à l'acquisition du fer puisqu'on sait que le cadmium agit en réduisant l'activité du fer et l'activité ferriréductase (118).

#### e) La réponse au stress oxydatif

En plus de ceux mentionnés plus haut, l'expression d'autres gènes encodant des protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif semble être contrôlée par Yap2p. Deux gènes codant pour des oxydoréductases potentielles, *CPD1* et *ZTA1*, font partie de ce nombre ((135), <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=zta1>). Le gène encodant une chaperone de la superoxyde dismutase Sod1p, *LYS7*, est également régulé par Yap2p (39). L'expression de

*YHB1*, codant pour la flavohémoglobine, semble également régulée par la surexpression de Yap2p. La flavohémoglobine agit au même titre que le glutathion et la thiorédoxine en complexant les radicaux libres (160). Une observation intéressante est que la surexpression de *YAP2* semble réguler à la baisse l'expression d'un gène codant pour une autre protéine de type bZIP, Hac1p. Cette protéine est impliquée dans le repliement des protéines en conditions de stress (93). Ces résultats confirment le rôle important joué par Yap2p dans la réponse au stress oxydatif.

#### f) Autres

Finalement, la surexpression de Yap2p provoque l'induction de l'expression du gène *DCG1* qui paraît être impliqué dans le métabolisme de l'azote. En effet, l'expression de ce gène est sensible aux catabolites comprenant un groupement azote (157). Finalement, un des gènes les plus induits suite à la surexpression de Yap2p est *FRM2* qui code pour une protéine participant à la voie de signalisation des acides gras (87). Ce résultat laisse donc envisager un rôle pour Yap2p dans la réponse au stress oxydatif causé par la  $\beta$ -oxydation des acides gras (voir section 4.2).

#### 4.1.1.4 Comparaison de notre approche à une autre

La technologie des biopuces a déjà été utilisée afin de déterminer les cibles de Yap2p. L'approche utilisée par Cohen *et al.* est différente de la notre (23). En effet, les souches sauvage, *yap1 $\Delta$*  et *yap2 $\Delta$*  ont été traitées ou non au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et une expérience de biopuces a été effectuée. L'expression des gènes dans la souche *yap1 $\Delta$*  ou *yap2 $\Delta$*  a été comparée à celle de la souche sauvage suite à un traitement au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'hypothèse de ces auteurs est que l'induction de l'expression des gènes observée dans la souche *yap2 $\Delta$*  traitée au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est engendrée par l'action de Yap1p. De même, l'induction de l'expression des gènes observée dans la souche *yap1 $\Delta$*  est causée par l'action de Yap2p. Ces inductions seraient uniquement provoquées par la présence de l'un ou l'autre des facteurs de transcription puisqu'elles sont absentes dans la souche *yap1 $\Delta$ yap2 $\Delta$* . Donc, dans la souche *yap1 $\Delta$* , on observerait seulement l'effet de Yap2p sur l'expression des gènes suite à un traitement au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Ils ont observé que le groupe de gènes dépendant de la présence de Yap1p était essentiellement constitué de gènes codant pour des protéines impliquées dans la détoxification de la cellule, telles la transférase de glutathion Gtt2p et la superoxyde dismutase Sod2p. Parallèlement, le groupe de gènes dépendant de la présence de Yap2p code principalement pour des protéines impliquées dans la stabilité et le repliement des protéines. Par exemple, une chaperone potentielle Apj1p et une enzymes de conjugaison à l'ubiquitine Ubc6p font parties de ce groupe. Aussi, 54% des gènes dépendants de Yap2p ont des rôles inconnus suggérant que le régulon Yap2p possède d'autres fonctions en plus de la stabilisation et du repliement des protéines. Selon ces auteurs, ces résultats peuvent aider à expliquer la relation entre les gènes dépendants de Yap1p et Yap2p. Par exemple, en absence de Yap2p, la réponse cellulaire suite à un traitement au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dépendante de Yap1p est grandement amplifiée. C'est peut-être parce qu'en absence des protéines responsables du repliement dépendantes de Yap2p, la cellule a un plus grand besoin de la réponse de détoxification ainsi, Yap1p est activée par la présence de protéines mal formées. En résumé, leurs résultats montrent que, malgré le fait que Yap1p et Yap2p soient de proches homologues ayant des phénotypes similaires, ces protéines ne sont pas redondantes. Yap1p et Yap2p activent différents régulons impliqués dans divers aspects de la réponse au stress où les gènes dépendants de Yap1p jouent un rôle dans la détoxification des ÉOR alors que les gènes dépendants de Yap2p aident à stabiliser et à replier les protéines dans un environnement oxydatif.

Les gènes dépendants de Yap2p observés par Cohen *et al.* sont complètement différents des nôtres. En fait, aucun des gènes trouvés par Cohen *et al.* n'est régulé à la hausse dans notre expérience et vice versa. Par ailleurs, leur approche ne leur a pas permis de détecter pour Yap1p des cibles impliquées dans la réponse au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tels que *TRX2* et *TSA1* (77). De plus, une autre étude à grande échelle a été réalisée par un autre groupe avec des cellules traitées ou non au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et en présence ou non de Yap1p. Cette étude a montré que l'expression de gènes tels que *TRR1* et *MDH2* est dépendante de la présence de Yap1p suite a un traitement au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (31). Ces deux gènes sont absents de la liste de cibles de Yap1p publiée par Cohen *et al.*

L'hypothèse de Cohen *et al.* ne tient pas compte de l'effet de la délétion elle-même sur l'expression des gènes. Pourtant, cette délétion peut provoquer une variation d'expression à la

hausse ou à la baisse de certains gènes et ce, sans l'influence de l'autre facteur encore présent. De plus, aucune confirmation des résultats n'a été réalisée et rien n'est mentionné à propos des autres protéines Yaps présentes dans la cellule et qui peuvent également avoir un effet sur l'expression des gènes. Par ailleurs, il est mentionné que les gènes régulés par Yap2p ne sont pas induits dans la souche sauvage traitée avec le  $H_2O_2$  puisque la délétion de *YAP2* ne confère pas l'hypersensibilité au  $H_2O_2$ . Alors qu'en réalité, la délétion de *YAP2* confère bel et bien une hypersensibilité au  $H_2O_2$  (résultat non présenté et 129).

Ces différences soulignent bien l'importance du choix des souches et des stratégies pour une étude à grande échelle utilisant l'approche des biopuces. La discordance entre les résultats de Cohen *et al.* et les nôtres peut s'expliquer en partie par le fait que les cibles de Yap2p conférant la résistance et l'hypersensibilité ne sont pas nécessairement les mêmes. Dans ce cas, notre expérience de biopuces nous a permis d'observer les gènes sous le contrôle de Yap2p contribuant à la résistance aux oxydants de manière générale alors que Cohen *et al.* observaient les gènes sous le contrôle de Yap2p responsables de la tolérance des cellules au  $H_2O_2$ .

#### 4.1.2 Régulation des gènes par Yap2p et Yap1p

Étant donné que Yap1p et Yap2p sont des homologues très proches, il est logique de penser que les gènes régulés par Yap1p pourraient également être régulés par Yap2p, et vice versa. Dans cette optique, ces deux facteurs pourraient se lier aux même séquences. La Table 5 présente les gènes trouvés par notre expérience de biopuces et indique si ces derniers sont connus pour être régulés par Yap1p et si leur promoteur contient des sites de liaison pour le facteur Yap1p (TTACTAA, TGAATA, TTAGTCA, (103)). Tous les types de situation sont illustrés dans ce tableau. Certains gènes sont régulés à la fois par Yap1p et Yap2p et d'autres seulement par un ou l'autre des facteurs. Aussi, le promoteur des gènes contient ou non des YRE connus. Il a été décrit que les facteurs bZIP agiraient probablement en homodimère ou hétérodimère afin de réguler leurs cibles (35). Dans cette optique, les gènes régulés par Yap1p et Yap2p pourraient

**Table 5. Comparaison des gènes régulés par Yap1p et Yap2p et de la présence de YRE dans leur région promotrice.** Les gènes listés dans cette table sont ceux répondant à la surexpression de *YAP2* tel que déterminé par les biopuces. La colonne Yap1p montre les gènes connus comme étant régulés par Yap1p (+) ou non (-). La colonne YRE souligne la présence de site de liaison pour le facteur Yap1p (YRE, TTACTAA, TCAGTAA, TTAGTGA) dans la région promotrice des gènes (1 kb avant l'ATG).

Gène	Yap1p	YRE	Référence
<b>1. Transporteurs</b>			
<i>FLR1</i>	+	+	1
<i>ARR3</i>	-	-	155
<i>YCF1</i>	+	+	84
<i>ATR1</i>	+	+	70
<i>PHO84</i>	-	-	30
<b>2. Déshydrogénases</b>			
<i>OYE3</i>	+	+	104
<i>AAD4</i>	+	+	29
<i>AAD16</i>	+	+	29
<i>AAD14</i>	+	-	29
<i>AAD6</i>	+	+	29
<i>AAD15</i>	+	+	29
<i>AAD10</i>	+	-	29
YNL134c	-	+	30
<i>OYE2</i>	+	+	104
<b>3. Voie du glutathion et de la thiorédoxine</b>			
<i>GTT2</i>	+	+	22
<i>GPX2</i>	+	+	59
<i>TRR1</i>	+	+	30
<b>4. Acquisition du fer</b>			
<i>FIT2</i>	-	-	30
<i>FRE1</i>	-	+	30
<i>FIT3</i>	ND	-	30
<i>ARN3</i>	-	-	30
<i>ARN4</i>	-	-	30
<i>FET3</i>	-	-	30
<b>5. Réponse au stress oxydatif</b>			
<i>YHB1</i>	-	+	30
YDR533c	-	+	30
<i>CPD1</i>	-	+	30
<i>LYS7</i>	+	+	30
<i>ZTA1</i>	-	+	30
<i>XRS2</i>	-	-	30
<i>HAC1</i>	-	+	30
<b>6. Autres</b>			
<i>FRM2</i>	+	-	30
<i>ARR2</i>	-	-	155
<i>SDL1</i>	-	+	30
YBR047w	-	+	30
<i>DCG1</i>	-	+	30
YHR199c	-	+	30
<i>DAN4</i>	-	-	30
<i>THI13</i>	-	+	30
<i>CAF17</i>	-	+	30

être contrôlés par un hétérodimère Yap1p-Yap2p ou indépendamment par l'un ou l'autre des facteurs. Dans ce cas, il se peut que des conditions particulières tel le type de stress oxydatif que subit les cellules favorisent la régulation par un facteur plus que l'autre. Aussi, la Table 5 permet d'observer que moins de la moitié des gènes régulés par Yap2p sont également régulés par Yap1p. Une expérience intéressante serait d'examiner l'expression de ces gènes dans les souches *yap1Δ*, *yap2Δ* et *yap1Δyap2Δ* en réponse à un stress tel un traitement au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou au cadmium. Si l'expression de ces gènes est complètement abolie dans la souche *yap1Δyap2Δ*, cela signifierait que ces deux facteurs sont les seuls régulateurs alors que si une expression résiduelle demeure, cela démontre que d'autres facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation des gènes testés.

De plus, on peut remarquer que tous les gènes impliqués dans l'acquisition du fer sont uniquement régulés par Yap2p et qu'aucun, sauf *FRE1*, ne contient de YRE connus. Cela laisse supposer que Yap2p pourrait être un facteur de transcription spécifique au métabolisme du fer et que l'activation de la transcription se ferait via un nouveau YRE ou indirectement. Il semble également que *ARR2* et *ARR3*, impliqués dans la détoxification de l'arsenate, ne sont pas régulés par Yap1p et ne contiennent pas de YRE connus dans leur région promotrice (155). Cela suggère fortement que la résistance à l'arsenate causée par *ARR2* et la résistance à l'arsenite causée par *ARR3* impliqueraient Yap2p. Par ailleurs, il est déjà bien caractérisé que Yap8p est impliquée dans cette résistance (155). Il se peut qu'un dimère Yap2p-Yap8p régule l'expression des gènes *ARR2* et *ARR3* ou que ces deux facteurs les régulent de manière indépendante mais chacun dans des conditions spécifiques (155). Il faudrait donc vérifier l'expression de base de ces deux gènes en présence et en absence de *YAP2* et/ou *YAP8* chez des souches traitées ou non à l'arsenite ou l'arsenate. Si l'expression du gène *ARR2* est supérieure chez une souche sauvage traitée à l'arsenate par rapport à une souche *yap2Δ* ou *yap8Δ*, cela signifie que Yap2p et Yap8p sont les deux régulateurs de *ARR2*. De la même manière, l'expression du gène *ARR3* sera supérieure chez une souche sauvage par rapport à une souche *yap2Δ* et *yap8Δ* traitées à l'arsenite si Yap2p et Yap8p sont les deux régulateurs.

### 4.1.3 Effecteurs de Yap2p dans la réponse au stress oxydatif

Il est connu que la surexpression de Yap2p confère la résistance au cadmium et au diamide ((151) et fig. 5). Les gènes obtenus par les expériences des biopuces nous ont fourni une liste d'effecteurs potentiels dans les phénotypes de résistance connus causés par la surexpression de *YAP2*. Afin d'en identifier quelques-uns, des tests de résistance au cadmium et au diamide ont été effectués sur les souches *ycf1Δ*, *flr1Δ* et *frm2Δ* surexprimant ou non *YAP2*. D'une part, *YCF1* et *FLR1* ont été choisis car il est déjà bien caractérisé qu'ils participent, seul ou ensemble, à la résistance à plusieurs composés toxiques (1:16). D'autre part, *FRM2* a été sélectionné puisqu'il est fortement induit suite à la surexpression de *YAP2* (Table 4). Aussi, son caractère unique a incité son choix puisque c'est la première fois qu'on observe qu'un facteur Yap pourrait réguler un gène impliqué dans le métabolisme des acides gras.

#### 4.1.3.1 Effecteur de Yap2p dans la réponse au cadmium

Le niveau de croissance de la souche *ycf1Δ*/p426GPD-*YAP2* est largement inférieur à celui observé chez la souche *YAP2*/p426GPD-*YAP2* sur un milieu contenant 15  $\mu$ M CdSO<sub>4</sub> (fig. 8). Cette observation suggère fortement que *YCF1* est un effecteur important dans la résistance au cadmium causée par la surexpression de *YAP2*. Ces résultats corroborent en plus les phénotypes déjà établis (141). *YCF1* pourrait donc être un exemple de gène régulé par Yap1p et Yap2p en réponse à une exposition des cellules au cadmium. Encore une fois, il serait intéressant de vérifier l'expression de base du gène *YCF1* dans les souches *yap1Δ*, *yap2Δ* et *yap1Δyap2Δ*. Il serait également envisageable d'évaluer le niveau d'induction de l'expression du gène *YCF1* dans les cellules sauvages, *yap1Δ*, *yap2Δ* et *yap1Δyap2Δ*. Si aucune expression du gène *YCF1* est détectée dans la souche *yap1Δyap2Δ* en réponse à un traitement au cadmium, cela suggère que Yap1p et Yap2p sont les deux facteurs de transcription régulant l'expression de *YCF1* en réponse au cadmium.

#### 4.1.3.2 Effecteurs de Yap2p dans la réponse au diamide

L'hypersensibilité au diamide a été observée chez les souches *flr1Δ/p426GPD* et *frm2Δ/p426GPD*, tout comme chez la souche contrôle *YAP2/p426GPD*, suggérant une implication de ces deux protéines dans la résistance au diamide (fig. 8). De plus, la croissance est fortement diminuée chez les souches *frm2Δ/p426GPD-YAP2* et *flr1Δ/p426GPD-YAP2* par rapport à la souche *YAP2/p426GPD-YAP2*, montrant bien l'importance de Frm2p et de Flr1p dans la résistance au diamide induite par la surexpression de *YAP2*. Comme mentionné, les souches *frm2Δ/p426GPD-YAP2* et *flr1Δ/p426GPD-YAP2* démontrent une croissance résiduelle en présence de diamide. Cela pourrait s'expliquer par la présence de *FLR1* dans la souche *frm2Δ/p426GPD-YAP2* et vice versa. Si *FLR1* et *FRM2* sont les deux seuls effecteurs de Yap2p dans la résistance au diamide, un test de résistance au diamide devrait montrer une abolition complète de cette croissance résiduelle chez une souche *frm2Δflr1Δ/p426GPD-YAP2*. Il faut aussi considérer l'effet de Yap1p sur l'induction de l'expression de *FRM2* en présence de diamide (fig. 9). Il est également bien caractérisé que la surexpression de Yap1p induit l'expression de *FLR1* (103). Il est donc envisageable que Yap1p et Yap2p soient les deux régulateurs de *FLR1* et *FRM2* dans la résistance au diamide.

Ces résultats sont en accord avec la littérature connue par rapport à Flr1p et suggèrent un deuxième exemple de régulation de Yap1p et Yap2p (103). Flr1p est donc impliquée dans la résistance à un nouvel agent oxydant, le diamide. Il se peut également que sous des conditions données, la régulation de *FLR1* par Yap1p soit privilégiée tandis que d'autres conditions favorisent la régulation par Yap2p. Il serait donc intéressant de vérifier l'implication de Yap1p et Yap2p sur l'expression de *FLR1* en présence de diamide en traitant des cellules sauvages, *yap1Δ*, *yap2Δ* et *yap1Δyap2Δ* au diamide et observer le niveau d'expression de *FLR1* par analyse Northern. Aucune expression de *FLR1* ne sera observée dans la souche *yap1Δyap2Δ* si ces deux facteurs sont les deux seuls régulateurs de l'expression de *FLR1* en réponse à un traitement au diamide. Comme peu de choses sont connues sur Frm2p, il est difficile de relier cette protéine à un phénomène de résistance. Il est toutefois possible de supposer qu'une enzyme impliquée dans le métabolisme des acides gras peut également être impliquée dans la résistance au stress oxydatif puisque la  $\beta$ -oxydation des acides gras est un événement majeur causant l'augmentation de ÉOR dans la cellule (91). En définitive, l'expérience des biopuces a permis l'identification de trois effecteurs de Yap2p impliqués dans la résistance au cadmium ou au diamide. De la même

manière, il sera possible, à l'aide des gènes identifiés par notre étude, d'identifier d'autres effecteurs de Yap2p impliqués dans d'autres fonctions telles la résistance pléiotropique aux composés toxiques et l'acquisition du fer.

## 4.2 Caractérisation de *FRM2*, un gène répondant à la surexpression de *YAP2*

### 4.2.1 Mécanismes de régulation de *FRM2* par *Yap2p*

Afin de documenter les mécanismes de régulation des gènes par Yap2p, une étude de la régulation de *FRM2* par Yap2p a été effectuée. Plusieurs caractéristiques en font un candidat de choix pour l'étude des mécanismes de régulation par Yap2p. Comme cité précédemment, cette préférence a été établie parce que ce gène est fortement induit dans l'expérience des biopuces. Aussi, son implication dans la résistance au diamide conférée par la surexpression de *YAP2* a été démontrée. De plus, notre étude allait permettre de préciser la fonction de *Frm2p*, qui n'est pas très détaillée. Pour commencer, la spécificité de l'induction de *FRM2* par Yap2p a été vérifiée. Cet objectif a été atteint en comparant l'expression de *FRM2* dans des souches qui surexpriment *YAP1* ou *YAP2*. Par Northern blot, il est clair que pour un niveau équivalent d'ARN de *YAP1* et *YAP2*, l'expression de *FRM2* est induite beaucoup plus fortement par Yap2p (fig. 9B). Il est important de noter que ce résultat résulte d'une surexpression forcée des facteurs de transcription et qu'il ne reflète peut-être pas parfaitement la réalité en réponse au stress oxydatif. Aussi, aucune information n'est disponible sur la quantité de protéines Yap1p et Yap2p présente dans la cellule. Il faut donc toujours garder en mémoire que *YAP1* est également capable d'induire l'expression de *FRM2* et que cela peut influencer les résultats futurs.

Afin de vérifier si l'expression de *FRM2* est modifiée suite à un stress oxydatif, des traitements au diamide ont été effectués avec les souches sauvage, *yap1Δ* et *yap2Δ*. Les souches ont par la suite été analysées par Northern blot. Cette expérience me permettait également d'observer la spécificité de la régulation de Yap1p et Yap2p sur l'expression de *FRM2* en réponse au stress oxydatif et ce, *in vivo*. Brièvement, *FRM2* est induit par le diamide et cette induction dépend en bonne partie de la présence de *YAP2*, montrant que Yap2p endogène régule



l'expression de *FRM2* en réponse à un stress oxydatif (fig. 9A). Ce résultat confirme que *FRM2* est une cible de Yap2p et un effecteur dans la résistance au diamide. Il est aussi important de noter que Yap1p semble jouer un rôle appréciable dans cette induction. Il serait donc intéressant de vérifier l'expression de *FRM2* dans une souche *yap1Δyap2Δ* traitée au diamide. Si une partie de l'induction demeure, cela signifierait que d'autres facteurs participent à la régulation de *FRM2* en réponse au diamide. Sinon, cette expérience démontrera que Yap1p et Yap2p sont les deux seuls régulateurs responsables de l'induction de *FRM2* en réponse à un traitement au diamide. Quoique qu'il en soit, tous ces résultats, ajouté au fait que *FRM2* est un effecteur de Yap2p dans la résistance au diamide, montrent clairement que Yap2p joue un rôle important dans l'expression de *FRM2*.

#### 4.2.2 Sites de liaison de Yap2p sur le promoteur *FRM2*

J'ai effectué la recherche de YRE connus dans le promoteur de *FRM2*. Cette analyse ne m'a pas permis d'identifier des YRE connus mais j'ai plutôt distingué cinq YRE atypiques (fig. 10A). Dans le but d'identifier les séquences *cis* impliquées dans la régulation de *FRM2* par Yap2p, j'ai construit des délétions séquentielles du promoteur *FRM2* fusionnées au gène rapporteur *LacZ*. Couplée à la mutagenèse dirigée de YRE, cette approche m'a permis de déterminer que le YRE1 TTATTAA était l'élément de régulation majeur du promoteur *FRM2* par Yap2p (fig. 10B). Finalement, la liaison de Yap2p-Myc au promoteur *FRM2* a été confirmée *in vivo* par une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine dans laquelle les souches sauvages et Yap2p-Myc ont été traitées au diamide (fig. 13). Dans le but de déterminer si le YRE1 est le site de liaison du promoteur *FRM2* par Yap2p en réponse à un traitement au diamide, une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine pourra être effectuée dans laquelle la souche *YAP2-MYC* transformée avec les plasmides sauvage -301 *FRM2P* ou -301 *FRM2P* mut.1 sera utilisée et des amorces spécifiques au promoteur cloné seront employées. Si le YRE1 est effectivement cet élément de régulation, aucune liaison de Yap2p-Myc ne sera obtenue chez la souche *YAP2-MYC/-301 FRM2P* mut.1. Toutefois, cette expérience serait réalisée sur des promoteurs clonés sur des vecteurs et ne représenterait pas parfaitement l'environnement endogène de la région promotrice.

Afin de confirmer au niveau endogène que le YRE1 est l'élément de régulation du promoteur *FRM2* par Yap2p, la mutagenèse du YRE1 endogène devra être exécutée. Cela pourra être réalisé à l'aide de la même stratégie utilisée pour l'intégration de l'épitope *MYC* au locus *YAP2* (fig. 11A). Le vecteur pMPY-3xHA pourra servir à la construction d'une cassette contenant des séquences provenant du promoteur *FRM2* (121). L'amplification de la cassette par PCR se fera à l'aide d'un oligonucléotide contenant une mutation dans le YRE1. De cette manière, lors de la recombinaison de la cassette au promoteur *FRM2*, le YRE1 sauvage sera remplacé par le YRE1 muté. La sélection des intégrants se fera une fois de plus grâce au marqueur *URA3*. Lorsque la présence de la mutation sera bien caractérisée, le marqueur de sélection ainsi que le deuxième épitope *HA* pourront être excisés à l'aide de l'acide 5-fluoro-orotique. L'immunoprécipitation de la chromatine pourra être effectuée sur les souches traitées ou non au diamide. Une conséquence de cette approche est qu'un épitope *HA* demeurera dans la séquence du promoteur *FRM2* et pourra modifier l'environnement aux abords du YRE1. Cependant, si cette approche et celle décrite précédemment montrent le même résultat, c'est-à-dire une absence de liaison de la protéine de fusion Yap2p-Myc sur le promoteur *FRM2* muté, cela signifiera que le YRE1 est le site de régulation du promoteur *FRM2* par Yap2p en réponse au diamide. Par contre, si une liaison est observée, cela suggère qu'un autre site de régulation existe. Dans ce cas, ce nouveau site, seul ou de concert avec le YRE1, pourra être important pour la régulation par Yap2p du promoteur *FRM2* en réponse au diamide.

#### 4.2.3 Nouvelle fonction pour *Frm2p*

Une étude à grande échelle a démontré qu'une mutation dans la séquence nucléotidique de *FRM2* entraîne la dérépression de l'expression du promoteur *OLE1* fusionné au gène *LacZ* et ce, en présence d'acide gras (87). Par contre, les mécanismes par lesquels *Frm2p* participe à la régulation du gène *OLE1* ne sont pas connus. Afin de préciser le rôle de cette protéine, une recherche bioinformatique dans les banques de données a montré que la séquence protéique de *Frm2p* est homologue à des nitroréductases bactériennes provenant de différents microorganismes tels que *Bacillus cereus*, *B. anthracis*, *Clostridium acetobutylinum* et *Bacteriodes thetaiotaomicron* (fig. 16). De plus, la banque de données contenant les familles de

protéines PROSITE prédit également que Frm2p appartient à la famille de nitroréductases identifiée par mes analyses (34). Cette nouvelle famille de protéines fait partie d'un plus grand ensemble d'oxydoréductases reliées aux nitroréductases, tel que prédit par la banque de données «Conserved Domain Database» (CDD) de NCBI. Ces résultats laissent donc présager un nouveau rôle pour Frm2p et possiblement pour Yap2p, dans un processus de nitro-réduction. Des essais de nitro-réduction utilisant des composés contenant un groupement azote, tels le  $\text{NaNO}_2$ , le nitrobenzoate et le p-toluidine nitrotoluène (TNT), devront être réalisés (126;127). Ces essais devront premièrement être effectués chez une souche sauvage de *S. cerevisiae* afin de vérifier si cette levure est en mesure de réduire les composés azotés. Si tel est le cas, les mêmes essais pourront être exécutés chez des souches surexprimant *YAP2* ou *FRM2* afin d'évaluer si la réduction des composés azotés est plus importante chez ces souches. À ce stade, il serait également essentiel de déterminer si Frm2p est l'unique nitroréductase chez *S. cerevisiae*.

Jusqu'à ce jour, les nitroréductases n'ont pas été décrites chez *S. cerevisiae*. Toutefois, elles sont bien caractérisées chez les bactéries, chez qui on en retrouve deux types. Les nitroréductases indépendantes de l'oxygène sont des flavoprotéines qui régulent le transfert de deux électrons provenant du NAD(P)H au groupement nitro d'un composé. Plusieurs intermédiaires actifs produits au cours de cette voie, incluant les dérivés nitroso- et hydroxylamines, sont plus tard réduits pour devenir inactifs. D'autre part, les nitroréductases dépendantes de l'oxygène contrôlent le transfert d'un électron simple, produisant des radicaux libres d'anions nitro. Ceux-ci, en présence d'oxygène, peuvent rapidement être oxydés de nouveau, générant des ÉOR superoxydes (108). On peut donc penser que Frm2p est préférentiellement une nitroréductase indépendante de l'oxygène puisque celle-ci utilise la voie de réduction des deux électrons qui diminue le nombre de ÉOR produit et donc diminue le stress oxydatif dans la cellule. Par conséquent, la voie de réduction des deux électrons joue un rôle de protection contre le stress oxydatif. Dans cette perspective, les expériences de nitro-réduction mentionnées plus haut devront être testées en milieu aérobique et anaérobique afin de clarifier ce point. Si Frm2p est véritablement une nitroréductase indépendante de l'oxygène, la nitro-réduction ne sera pas influencée par la présence ou l'absence d'oxygène.

**Fig. 16** Alignement de séquences protéiques de Frm2p de *S. cerevisiae* et des nitroréductases provenant de divers miro-organismes. Un «blast» de protéine-protéine a été effectué en utilisant la séquence protéique de Frm2p provenant de la banque de données de SGD. Les séquences obtenues par le «blast» ont été transférées dans le programme Emboss afin de procéder à l'alignement. Ce dernier a finalement été transféré au programme Gene Doc qui a exécuté l'encadrement des bases identiques ou similaires. Le noir représente les bases identiques ou similaires dans les cinq séquences, le gris foncé dans quatre séquences et le gris pâle dans trois séquences. L'encadré montre la valeur E qui mesure le degré de discordance entre les séquences.

*S. cerevisiae* MSPTGNTILNATNERTITNLKPELPQGVGLDDVVRTMHVILKNTPTAFNSQVNEPAWIIIVEDTHKFRIMDAVASAMP-----  
*B. cereus* --MTKDEYTTALKERERTYTGINKEVQMSD--EKIKEIIVEFAVRYTSPSAFNSQTARLAVVLFGEAHDKIMDITTETLRKVVVG  
*C. acetobutylicum* --MTKDEYTTALKERERTYTGINKEVQMSD--EKIKEIIVEFAVRYTSPSAFNSQTARLAVVLFGEAHDKIMDITTETLRKVVVG  
*B. anthracis* --MSKDEYEA VKKERTITIGIGKESPISD--ERIKETIVELLWKEETPSESNSQSSRVVVLFEKNHDKLMEITTKETLRKIIVP  
*Ba. thetaiotaomicron* --MERTESEALKNERITYISTDJSPIPD--QETECTLINLAWRHVPSAFNSQSTRVVLLLEKSHKFLMNIIVKDALRRKIIVP

*S. cerevisiae* ---TAEAKKPEPESCRDEATGSVIFFEETDEGPTTEKLCQRDEPPALAAAPFTCAAHDTGAVTIQSMATALELLLELECANLQHTINDY  
*B. cereus* DGDESGTQQKMD--SEKAGTGTVLFPEDEATVKSLSQKEKEAAKAAENPEETMSYQASGMHQLVVMVTGLEAELEASLQHTINDY  
*C. acetobutylicum* DGDESGTQQKMD--SEKAGTGTVLFPEDEATVKSLSQKEKEFAAYAAENPEETMSHQASGMHQLVVMVTGLEAELEASLQHTINDY  
*B. anthracis* EGNESSTEEKIN--SEKSGTGTILTFEEDQNVKSLQDQFQLYKDNFFVMSSEQSSGMLTINIMNAUSLELEASLQHTINDY  
*Ba. thetaiotaomicron* GEAEFAKTEEKIDNSEACGTGTVLFPEEDQKVVKGLQEAFPSPYQENEFEGMSLQTSAMHQLAVMMVMLEDVFEASLQHTINDY

Note
----
2e-27
2e-26
2e-26
5e-24

*S. cerevisiae* VKSALP--QDVPIAMTVQSOLVEVEVETALPEEERTEINNVINWYH--  
*B. cereus* IDDEIKQENNVFANMKLLIACMPFCNPTAAPGEEEQPLEERVVKFHK  
*C. acetobutylicum* IDDEVKQENNVFANMKLLIACMPFCNPTAAPGEEEQPLEERVVKFHK  
*B. anthracis* IDDAVRDEWHIFONMKLIGCMPFEKPTADFCNDDEIPIDSRVKFF--  
*Ba. thetaiotaomicron* IDDEVRRAMNLPAMHHLIAEMPECVFNKEGEEEQPLEERIKVFK

Par ailleurs, plusieurs nitroréductases et oxydoréductases bactériennes sont impliquées dans les phénomènes de résistance aux antibiotiques. Par exemple, il est bien décrit que la nitroréductase indépendante de l'oxygène RdxA et l'oxydoréductase Frxa jouent des rôles importants dans l'émergence de la résistance à l'antibiotique métronidazole, un composant majeur employé contre plusieurs bactéries, incluant *Helicobacter pylori*. Cette dernière cause entre autres des gastro-entérites et est importante dans l'apparition des signes primaires de métaplasie gastrique (49;150). Chez l'humain, l'expression de l'oxydoréductase NQO1 est induite de manière concomitante à d'autres protéines de détoxification en réponse à des oxydants, des métaux lourds et des radiations (64). Cette oxydoréductase est régulée par Jun, protéine bZIP homologue à Yap2p, via l'élément de régulation ARE présent dans le promoteur *NQO1* en réponse au stress oxydatif (64). En transposant ces connaissances chez *S. cerevisiae*, il est plausible que Frm2p puisse agir en tant que nitroréductase-oxydoréductase et soit sous le contrôle d'un régulon composé de Yap1p et Yap2p et ce, en réponse au stress oxydatif causé par le diamide et/ou l'acide oléique.

#### 4.2.4 Implication potentielle de Yap2p dans la voie de signalisation des acides gras

Le ratio d'acides gras saturés/insaturés incorporés dans les membranes biologiques est très important pour la fluidité membranaire. Chez la levure, ce ratio joue également un rôle dans la tolérance à l'éthanol, la réponse au choc thermique, le mouvement des mitochondries et l'hérédité (100). Une enzyme clé impliquée dans la régulation de ce ratio est la désaturase d'acide gras essentielle Ole1p, liée à la membrane du réticulum endoplasmique. Cette protéine introduit un double brin *cis* entre les carbones 9 et 10 des acides gras saturés palmitoyl- et stéaroyl-CoA, formant l'acide palmitoléique et oléique, respectivement (106). L'expression d'*OLE1* est régulée au niveau de la transcription et de la stabilité de son ARNm en réponse à la composition en acides gras et au niveau d'oxygène moléculaire présents dans l'environnement de la cellule. Sa transcription est contrôlée via deux éléments distincts dans son promoteur, l'élément de réponse aux acides gras (ERA) et l'élément de réponse à une basse concentration d'oxygène (ERBO) (86). Ce dernier amplifie dramatiquement l'activation de l'expression par le ERA en conditions hypoxiques ou en présence de cobalt (86). L'activation de la transcription d'*OLE1* via ces deux

éléments est réprimée par la présence d'acides gras insaturés puisque l'action de la désaturase n'est plus essentielle (86). L'expression d'*OLE1* est régulée par deux protéines homologues, Spt23p et Mga2p, qui activent l'expression d'*OLE1* via leur région N-terminale. Ces deux protéines sont liées à la membrane et doivent être clivées par un mécanisme dépendant de l'ubiquitine, impliquant le protéosome 23S, afin d'être activées (86).

Il a déjà été documenté qu'une mutation dans le gène *FRM2* cause une dérépression de l'expression d'*OLE1* en présence d'acide gras insaturé (87). Mes résultats montrent que l'expression d'*OLE1* est déréprimée dans les souches *frm2Δ* ou *yap2Δ* exposées à l'acide oléique pendant 18 heures (fig.14). Ce résultat laisse présager un rôle pour Yap2p dans la voie de signalisation des acides gras. On sait qu'une membrane composée d'une grande quantité d'acide gras saturés rend la cellule plus résistante au stress oxydatif (55;128). D'après les connaissances actuelles, le modèle suivant pourrait être proposé (fig. 17). Premièrement, la présence d'acides gras insaturés dans le milieu provoque un stress oxydatif temporaire pouvant être causé par une augmentation de la  $\beta$ -oxydation des acides gras (55;128). Ce stress oxydatif mène à l'oxydation et à l'activation de Yap2p. Cette dernière pourrait être le senseur direct du stress ou être activée via une autre protéine. Ensuite, Yap2p oxydée active sa cible transcriptionnelle, *FRM2*. Celle-ci pourra réprimer la transcription d'*OLE1*, soit directement ou indirectement. Finalement, l'absence d'Ole1p provoque l'augmentation du ratio représenté par le rapport de la quantité d'acide gras saturés/insaturés, menant à une augmentation de la résistance au stress oxydatif. Il se peut que Frm2p agisse sur les facteurs de transcription connus d'*OLE1*, soient Spt23p et Mga2p. On peut supposer que la fonction d'oxydoréductase de Frm2p agisse en réduisant Spt23p ou Mga2p, qui deviendraient ainsi inactifs. Comme la dérépression d'*OLE1* s'observe après 18 heures de traitement à l'acide oléique, il est plus vraisemblable que cette régulation nécessite la transcription et la traduction des protéines impliquées. Il se peut également que l'accumulation d'une certaine quantité d'ÉOR soit nécessaire afin de déclencher le mécanisme de régulation. Une conséquence de la  $\beta$ -oxydation des acides gras est la production d'ÉOR. Par contre, cette dernière n'est pas aussi rapide que lorsque la cellule est exposée à des agents oxydants, c'est pourquoi un traitement de 18 heures pourrait être nécessaire à l'accumulation d'une bonne

**Fig. 17 Modèle proposé de l'implication de Yap2p dans la voie de signalisation des acides gras.** La présence d'acides gras insaturés provoque un stress oxydatif temporaire, menant à l'activation directe ou indirecte de Yap2p. Celle dernière peut aller induire l'expression de *FRM2*. Frm2p peut réprimer l'expression d'OLE1, directement ou indirectement.



Acides gras insaturés



Stress oxydatif



Yap2p



Frm2p



*OLE1*



$$\frac{\text{acides gras saturés}}{\text{acides gras insaturés}} \uparrow$$

quantité d'ÉOR. Une première expérience à réaliser est d'analyser la quantité d'ARNm et de protéines de *SPT23* et *MGA2* dans les souches *yap2*<sup>-</sup> et *frm2*<sup>-</sup> au cours du traitement à l'acide oléique. De cette manière, il sera possible de savoir si Frm2p ou Yap2p agissent sur *SPT23* et *MGA2*, au niveau de la transcription ou la traduction. Cependant, il est peu probable que Yap2p agisse sur *SPT23* et *MGA2* au niveau de l'ARN puisque ce résultat aurait été observé lors de notre expérience de biopuces. Il se peut également que cette régulation n'implique pas Spt23p et Mga2p. Dans ce cas, il est possible que cette régulation soit directe et que Frm2p réprime l'expression d'*OLE1*, soit en empêchant sa transcription ou sa traduction ou en déstabilisant son ARNm. Par contre, il est peu concevable que Frm2p agisse sur la transcription d'*OLE1* puisqu'elle est localisée au cytoplasme (<http://www.yeastgenome.org/>). Finalement, il est concevable, mais improbable, que Yap2p régule l'expression d'*OLE1* indépendamment de Frm2p.

## **CHAPITRE 5 : CONCLUSION**

Pour conclure, la famille des facteurs de transcription de type bZIP Yaps chez *S. cerevisiae* est impliquée dans la réponse à différents stress et dans la résistance pléiotropique aux composés toxiques. Yap2p est un facteur important dans la réponse au stress oxydatif. Sa surexpression cause la résistance aux oxydants tels le cadmium, le 1,10-phénantroline et le diamide. Ses cibles ont été déterminées par biopuces. Plusieurs des gènes trouvés codent pour des protéines ayant des rôles bien caractérisés dans la résistance au stress oxydatif et dans la résistance pléiotropique aux composés toxiques. L'expression de *FRM2*, un gène trouvé par les biopuces, est induite en réponse à un traitement au diamide. Cette induction est fortement dépendante de la présence de Yap2p. Cette dernière semble réguler l'expression de *FRM2* via le site de liaison TTATTAA. Les résultats apportés par mon projet de maîtrise ont amené de l'information quant aux mécanismes par lesquels Yap2p est impliquée dans la réponse au stress oxydatif, plus spécifiquement comment elle régule ses cibles. L'utilisation d'approches génétiques et génomiques chez *S. cerevisiae* fait de cette levure un modèle de choix pour l'étude de la réponse à différents stress au niveau moléculaire. De plus, l'information acquise quant à la réponse au stress oxydatif chez *S. cerevisiae* pourra être transposée chez les levures pathogènes et servira à mieux comprendre les interactions hôte-pathogène lors d'infections fongiques. Finalement, cette information aidera à l'élaboration de nouvelles stratégies visant à mieux traiter les infections causées par ces levures pathogènes.

## **CHAPITRE 6 : SOURCE DOCUMENTAIRE**

- (1) Alarco AM, Raymond M. The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. J Bacteriol 1999; 181(3):700-708.
- (2) Alonso-Monge R, Navarro-Garcia F, Roman E, Negredo AI, Eisman B, Nombela C et al. The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. Eukaryot Cell 2003; 2(2):351-361.
- (3) Amoros M, Estruch F. Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes *HSP26* and *HSP104* in a gene- and stress type-dependent manner. Mol Microbiol 2001; 39(6):1523-1532.
- (4) Avery AM, Avery SV. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. J Biol Chem 2001; 276(36):33730-33735.
- (5) Azevedo D, Tacnet F, Delaunay A, Rodrigues-Pousada C, Toledano MB. Two redox centers within Yap1 for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and thiol-reactive chemicals signaling. Free Radic Biol Med 2003; 35(8):889-900.
- (6) Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Nat Rev Drug Discov 2004; 3(3):205-214.
- (7) Bauer BE, Wolfger H, Kuchler K. Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. Biochim Biophys Acta 1999; 1461(2):217-236.
- (8) Beaudoin J, Labbe S. The fission yeast copper-sensing transcription factor Cuf1 regulates the copper transporter gene expression through an Ace1/Amt1-like recognition sequence. J Biol Chem 2001; 276(18):15472-15480.
- (9) Billard P, Dumond H, Bolotin-Fukuhara M. Characterization of an AP-1-like transcription factor that mediates an oxidative stress response in *Kluyveromyces lactis*. Mol Gen Genet 1997; 257(1):62-70.
- (10) Bobrowicz P, Wysocki R, Owsianik G, Goffeau A, Ulaszewski S. Isolation of three contiguous genes, *ACR1*, *ACR2* and *ACR3*, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 1997; 13(9):819-828.
- (11) Bossier P, Fernandes L, Rocha D, Rodrigues-Pousada C. Overexpression of *YAP2*, coding for a new yAP protein, and *YAP1* in *Saccharomyces cerevisiae* alleviates growth inhibition caused by 1,10-phenanthroline. J Biol Chem 1993; 268(31):23640-23645.
- (12) Bourdineaud JP, De Sampaio G, Lauquin GJ. A Rox1-independent hypoxic pathway in yeast. Antagonistic action of the repressor Ord1 and activator Yap1 for hypoxic expression of the *SRP1/TIR1* gene. Mol Microbiol 2000; 38(4):879-890.

- (13) Bourret RB, Borkovich KA, Simon MI. Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem* 1991; 60:401-441.
- (14) Boy-Marcotte E, Lagniel G, Perrot M, Bussereau F, Boudsocq A, Jacquet M et al. The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Mol Microbiol* 1999; 33(2):274-283.
- (15) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
- (16) Broco N, Tenreiro S, Viegas CA, Sa-Correia I. *FLR1* gene (ORF *YBR008c*) is required for benomyl and methotrexate resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and its benomyl-induced expression is dependent on pdr3 transcriptional regulator. *Yeast* 1999; 15(15):1595-1608.
- (17) Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 2000; 3(1):3-8.
- (18) Carmel-Harel O, Storz G. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54:439-461.
- (19) Cavigelli M, Li WW, Lin A, Su B, Yoshioka K, Karin M. The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *EMBO J* 1996; 15(22):6269-6279.
- (20) Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* 1994; 269(44):27670-27678.
- (21) Charizanis C, Juhnke H, Krems B, Entian KD. The oxidative stress response mediated via Pos9/Skn7 is negatively regulated by the Ras/PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 1999; 261(4-5):740-752.
- (22) Choi JH, Lou W, Vancura A. A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1998; 273(45):29915-29922.
- (23) Cohen BA, Pilpel Y, Mitra RD, Church GM. Discrimination between paralogs using microarray analysis: application to the Yap1p and Yap2p transcriptional networks. *Mol Biol Cell* 2002; 13(5):1608-1614.
- (24) Coleman ST, Tseng E, Moye-Rowley WS. *Saccharomyces cerevisiae* basic region-leucine zipper protein regulatory networks converge at the *ATR1* structural gene. *J Biol Chem* 1997; 272(37):23224-23230.
- (25) Costa V, Moradas-Ferreira P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol Aspects Med* 2001; 22(4-5):217-246.

- (26) Craig EA, Weissman JS, Horwich AL. Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell* 1994; 78(3):365-372.
- (27) Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB. A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 2002; 111(4):471-481.
- (28) Delneri D, Gardner DC, Bruschi CV, Oliver SG. Disruption of seven hypothetical aryl alcohol dehydrogenase genes from *Saccharomyces cerevisiae* and construction of a multiple knock-out strain. *Yeast* 1999; 15(15):1681-1689.
- (29) Delneri D, Gardner DC, Oliver SG. Analysis of the seven-member AAD gene set demonstrates that genetic redundancy in yeast may be more apparent than real. *Genetics* 1999; 153(4):1591-1600.
- (30) DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 1997; 278(5338):680-686.
- (31) Dumond H, Danielou N, Pinto M, Bolotin-Fukuhara M. A large-scale study of Yap1p-dependent genes in normal aerobic and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stress conditions: the role of Yap1p in cell proliferation control in yeast. *Mol Microbiol* 2000; 36(4):830-845.
- (32) Estruch F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* 2000; 24(4):469-486.
- (33) Falcon-Perez JM, Martinez-Burgos M, Molano J, Mazon MJ, Eraso P. Domain interactions in the yeast ATP binding cassette transporter Ycf1p: intragenic suppressor analysis of mutations in the nucleotide binding domains. *J Bacteriol* 2001; 183(16):4761-4770.
- (34) Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, Sigrist CJ, Hofmann K et al. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(1):235-238.
- (35) Fernandes L, Rodrigues-Pousada C, Struhl K. Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol Cell Biol* 1997; 17(12):6982-6993.
- (36) Fernandes M, Xiao H, Lis JT. Binding of heat shock factor to and transcriptional activation of heat shock genes in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* 1995; 23(23):4799-4804.
- (37) Fujii Y, Shimizu T, Toda T, Yanagida M, Hakoshima T. Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors. *Nat Struct Biol* 2000; 7(10):889-893.
- (38) Furuchi T, Ishikawa H, Miura N, Ishizuka M, Kajiya K, Kuge S et al. Two nuclear proteins, Cin5 and Ydr259c, confer resistance to cisplatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol* 2001; 59(3):470-474.
- (39) Gamonet F, Lauquin GJ. The *Saccharomyces cerevisiae* LYS7 gene is involved in oxidative stress protection. *Eur J Biochem* 1998; 251(3):716-723.

- (40) Giardina C, Lis JT. Dynamic protein-DNA architecture of a yeast heat shock promoter. *Mol Cell Biol* 1995; 15(5):2737-2744.
- (41) Gomes DS, Fragoso LC, Riger CJ, Panek AD, Eleutherio EC. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1573(1):21-25.
- (42) Gralla EB, Valentine JS. Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *J Bacteriol* 1991; 173(18):5918-5920.
- (43) Grant CM, Collinson LP, Roe JH, Dawes IW. Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Microbiol* 1996; 21(1):171-179.
- (44) Gross C, Kelleher M, Iyer VR, Brown PO, Winge DR. Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J Biol Chem* 2000; 275(41):32310-32316.
- (45) Guzzo A, Karatzios C, Diorio C, DuBow MS. Metallothionein-II and ferritin H mRNA levels are increased in arsenite-exposed HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205(1):590-595.
- (46) Ha N, Hellauer K, Turcotte B. Mutations in target DNA elements of yeast *HAP1* modulate its transcriptional activity without affecting DNA binding. *Nucleic Acids Res* 1996; 24(8):1453-1459.
- (47) Halliwell B. Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: what is its mechanism of action? *Free Radic Biol Med* 1989; 7(6):645-651.
- (48) Hamer DH. Metallothionein. *Annu Rev Biochem* 1986; 55:913-951.
- (49) Hansson LE, Nyren O, Hsing AW, Bergstrom R, Josefsson S, Chow WH et al. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *N Engl J Med* 1996; 335(4):242-249.
- (50) Hasan R, Leroy C, Isnard AD, Labarre J, Boy-Marcotte E, Toledano MB. The control of the yeast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol Microbiol* 2002; 45(1):233-241.
- (51) Heick HM, Graff GL, Humpers JE. The occurrence of ascorbic acid among the yeasts. *Can J Microbiol* 1972; 18(5):597-600.
- (52) Hertle K, Haase E, Brendel M. The *SNQ3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* confers hyper-resistance to several functionally unrelated chemicals. *Curr Genet* 1991; 19(6):429-433.

- (53) Hirata D, Yano K, Miyakawa T. Stress-induced transcriptional activation mediated by *YAP1* and *YAP2* genes that encode the Jun family of transcriptional activators in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 1994; 242(3):250-256.
- (54) Hon T, Dodd A, Dirmeier R, Gorman N, Sinclair PR, Zhang L et al. A mechanism of oxygen sensing in yeast. Multiple oxygen-responsive steps in the heme biosynthetic pathway affect Hap1 activity. *J Biol Chem* 2003; 278(50):50771-50780.
- (55) Howlett NG, Avery SV. Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63(8):2971-2976.
- (56) Huang ME, Rio AG, Nicolas A, Kolodner RD. A genomewide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes that suppress the accumulation of mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(20):11529-11534.
- (57) Hughes TR, Marton MJ, Jones AR, Roberts CJ, Stoughton R, Armour CD et al. Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* 2000; 102(1):109-126.
- (58) Hussain M, Lenard J. Characterization of *PDR4*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that confers pleiotropic drug resistance in high-copy number: identity with *YAP1*, encoding a transcriptional activator [corrected]. *Gene* 1991; 101(1):149-152.
- (59) Inoue Y, Matsuda T, Sugiyama K, Izawa S, Kimura A. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1999; 274(38):27002-27009.
- (60) Ishikawa T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci* 1992; 17(11):463-468.
- (61) Isoyama T, Murayama A, Nomoto A, Kuge S. Nuclear import of the yeast AP-1-like transcription factor Yap1p is mediated by transport receptor Pse1p, and this import step is not affected by oxidative stress. *J Biol Chem* 2001; 276(24):21863-21869.
- (62) Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 1983; 153(1):163-168.
- (63) Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(8):4569-4574.
- (64) Jaiswal AK. Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(3-4):254-262.
- (65) Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1998; 14(16):1511-1527.



- (66) Jamieson DJ, Rivers SL, Stephen DW. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology* 1994; 140 ( Pt 12):3277-3283.
- (67) Juhnke H, Krems B, Kotter P, Entian KD. Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. *Mol Gen Genet* 1996; 252(4):456-464.
- (68) Jungmann J, Reins HA, Lee J, Romeo A, Hassett R, Kosman D et al. *MAC1*, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *EMBO J* 1993; 12(13):5051-5056.
- (69) Jungwirth H, Wendler F, Platzer B, Bergler H, Hogenauer G. Diazaborine resistance in yeast involves the efflux pumps Ycf1p and Flr1p and is enhanced by a gain-of-function allele of gene *YAP1*. *Eur J Biochem* 2000; 267(15):4809-4816.
- (70) Kanazawa S, Driscoll M, Struhl K. *ATR1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a transmembrane protein required for aminotriazole resistance. *Mol Cell Biol* 1988; 8(2):664-673.
- (71) Kolaczowska A, Goffeau A. Regulation of pleiotropic drug resistance in yeast. *Drug Resist Updat* 1999; 2(6):403-414.
- (72) Kudo N, Taoka H, Toda T, Yoshida M, Horinouchi S. A novel nuclear export signal sensitive to oxidative stress in the fission yeast transcription factor Pap1. *J Biol Chem* 1999; 274(21):15151-15158.
- (73) Kuge S, Jones N. *YAP1* dependent activation of *TRX2* is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J* 1994; 13(3):655-664.
- (74) Kuge S, Jones N, Nomoto A. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J* 1997; 16(7):1710-1720.
- (75) Kuge S, Toda T, Iizuka N, Nomoto A. Crm1 (Xpo1) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes Cells* 1998; 3(8):521-532.
- (76) Lee HC, Hon T, Lan C, Zhang L. Structural environment dictates the biological significance of heme-responsive motifs and the role of Hsp90 in the activation of the heme activator protein Hap1. *Mol Cell Biol* 2003; 23(16):5857-5866.
- (77) Lee J, Godon C, Lagniel G, Spector D, Garin J, Labarre J et al. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* 1999; 274(23):16040-16046.
- (78) Lee TI, Rinaldi NJ, Robert F, Odom DT, Bar-Joseph Z, Gerber GK et al. Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 2002; 298(5594):799-804.

- (79) Lesuisse E, Blaiseau PL, Dancis A, Camadro JM. Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 2001; 147(Pt 2):289-298.
- (80) Lesuisse E, Labbe P. Effects of cadmium and of *YAP1* and *CAD1 YAP2* genes on iron metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 1995; 141 ( Pt 11):2937-2943.
- (81) Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994; 233:346-357.
- (82) Levitz SM. Overview of host defenses in fungal infections. *Clin Infect Dis* 1992; 14 Suppl 1:S37-S42.
- (83) Li S, Dean S, Li Z, Horecka J, Deschenes RJ, Fassler JS. The eukaryotic two-component histidine kinase Sln1p regulates *OCH1* via the transcription factor, Skn7p. *Mol Biol Cell* 2002; 13(2):412-424.
- (84) Li ZS, Szczypka M, Lu YP, Thiele DJ, Rea PA. The yeast cadmium factor protein (*YCF1*) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J Biol Chem* 1996; 271(11):6509-6517.
- (85) Mansour MK, Levitz SM. Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol* 2002; 5(4):359-365.
- (86) Martin CE, Oh CS, Kandasamy P, Chellapa R, Vemula M. Yeast desaturases. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(Pt 6):1080-1082.
- (87) McHale MW, Kroening KD, Bernlohr DA. Identification of a class of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in fatty acid repression of gene transcription and analysis of the *FRM2* gene. *Yeast* 1996; 12(4):319-331.
- (88) Mendizabal I, Rios G, Mulet JM, Serrano R, de Larrinoa IF. Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett* 1998; 425(2):323-328.
- (89) Miller JH. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press ed. 1972.
- (90) Miyahara K, Hirata D, Miyakawa T. yAP-1- and yAP-2-mediated, heat shock-induced transcriptional activation of the multidrug resistance ABC transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 1996; 29(2):103-105.
- (91) Moradas-Ferreira P, Costa V. Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Rep* 2000; 5(5):277-285.
- (92) Morgan BA, Banks GR, Toone WM, Raitt D, Kuge S, Johnston LH. The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1997; 16(5):1035-1044.

- (93) Mori K, Kawahara T, Yoshida H, Yanagi H, Yura T. Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells* 1996; 1(9):803-817.
- (94) Moye-Rowley WS. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryot Cell* 2003; 2(3):381-389.
- (95) Moye-Rowley WS, Harshman KD, Parker CS. Yeast *YAP1* encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes Dev* 1989; 3(3):283-292.
- (96) Mukhopadhyay R, Shi J, Rosen BP. Purification and characterization of ACR2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *J Biol Chem* 2000; 275(28):21149-21157.
- (97) Muller EG. A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Mol Biol Cell* 1996; 7(11):1805-1813.
- (98) Mumberg D, Muller R, Funk M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 1995; 156(1):119-122.
- (99) Murphy JW. Immunological down-regulation of host defenses in fungal infections. *Mycoses* 1999; 42 Suppl 2:37-43.
- (100) Nakagawa Y, Ueda A, Kaneko Y, Harashima S. Merging of multiple signals regulating delta9 fatty acid desaturase gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 2003; 269(3):370-380.
- (101) Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG et al. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* 2001; 21(13):4347-4368.
- (102) Netto LES, Chae HZ, Kang SW, Rhee SG, Stadtman ER. Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. *J Biol Chem* 1996; 271(26):15315-15321.
- (103) Nguyen DT, Alarco AM, Raymond M. Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator *FLR1* gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents. *J Biol Chem* 2001; 276(2):1138-1145.
- (104) Niino YS, Chakraborty S, Brown BJ, Massey V. A new old yellow enzyme of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1995; 270(5):1983-1991.
- (105) Noel J, Turcotte B. Zinc cluster proteins Leu3p and Uga3p recognize highly related but distinct DNA targets. *J Biol Chem* 1998; 273(28):17463-17468.
- (106) Ntambi JM. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res* 1999; 40(9):1549-1558.

- (107) Oskouian B, Saba JD. *YAP1* confers resistance to the fatty acid synthase inhibitor cerulenin through the transporter Flr1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 1999; 261(2):346-353.
- (108) Paterson ES, Boucher SE, Lambert IB. Regulation of the *nfsA* Gene in *Escherichia coli* by SoxS. *J Bacteriol* 2002; 184(1):51-58.
- (109) Pena MM, Koch KA, Thiele DJ. Dynamic regulation of copper uptake and detoxification genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1998; 18(5):2514-2523.
- (110) Perego P, Gatti L, Carenini N, Dal Bo L, Zunino F. Apoptosis induced by extracellular glutathione is mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and DNA damage. *Int J Cancer* 2000; 87(3):343-348.
- (111) Pinkham JL, Wang Z, Alsina J. Heme regulates *SOD2* transcription by activation and repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 1997; 31(4):281-291.
- (112) Raitt DC, Johnson AL, Erkin AM, Makino K, Morgan B, Gross DS et al. The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell* 2000; 11(7):2335-2347.
- (113) Rassow J, Voos W, Pfanner N. Partner proteins determine multiple functions of Hsp70. *Trends Cell Biol* 1995; 5(5):207-212.
- (114) Rebbeor JF, Connolly GC, Dumont ME, Ballatori N. ATP-dependent transport of reduced glutathione in yeast secretory vesicles. *Biochem J* 1998; 334 ( Pt 3):723-729.
- (115) Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 2000; 16(6):276-277.
- (116) Rosen BP. Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol* 1999; 7(5):207-212.
- (117) Ruiz-Echevarria MJ, Peltz SW. The RNA binding protein Pub1 modulates the stability of transcripts containing upstream open reading frames. *Cell* 2000; 101(7):741-751.
- (118) Rutherford JC, Bird AJ. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell* 2004; 3(1):1-13.
- (119) Sanchez Y, Taulien J, Borkovich KA, Lindquist S. Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J* 1992; 11(6):2357-2364.
- (120) Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M et al. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med* 1997; 336(17):1216-1222.

- (121) Schneider BL, Steiner B, Seufert W, Futcher AB. pMPY-ZAP: a reusable polymerase chain reaction-directed gene disruption cassette for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1996; 12(2):129-134.
- (122) Schnell N, Krems B, Entian KD. The *PARI* (*YAP1/SNQ3*) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism. *Curr Genet* 1992; 21(4-5):269-273.
- (123) Sherman F. Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 1991; 194:3-21.
- (124) Silar P, Butler G, Thiele DJ. Heat shock transcription factor activates transcription of the yeast metallothionein gene. *Mol Cell Biol* 1991; 11(3):1232-1238.
- (125) Singh KK. The *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p-Ssk1p two-component system mediates response to oxidative stress and in an oxidant-specific fashion. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(10):1043-1050.
- (126) Snellinx Z, Nepovim A, Taghavi S, Vangronsveld J, Vanek T, van der LD. Biological remediation of explosives and related nitroaromatic compounds. *Environ Sci Pollut Res Int* 2002; 9(1):48-61.
- (127) Spain JC. Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49:523-555.
- (128) Steels EL, Learmonth RP, Watson K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology* 1994; 140 (Pt 3):569-576.
- (129) Stephen DW, Rivers SL, Jamieson DJ. The role of the *YAP1* and *YAP2* genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 1995; 16(3):415-423.
- (130) Sugiyama K, Izawa S, Inoue Y. The Yap1p-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2000; 275(20):15535-15540.
- (131) Tenreiro S, Rosa PC, Viegas CA, Sa-Correia I. Expression of the *AZRI* gene (ORF *YGR224w*), encoding a plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily, is required for adaptation to acetic acid and resistance to azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2000; 16(16):1469-1481.
- (132) Toone WM, Jones N. AP-1 transcription factors in yeast. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9(1):55-61.
- (133) Toone WM, Morgan BA, Jones N. Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond. *Oncogene* 2001; 20(19):2336-2346.

- (134) Veal EA, Ross SJ, Malakasi P, Peacock E, Morgan BA. Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor. *J Biol Chem* 2003; 278(33):30896-30904.
- (135) Ververidis P, Davrazou F, Diallinas G, Georgakopoulos D, Kanellis AK, Panopoulos N. A novel putative reductase (Cpd1p) and the multidrug exporter Snq2p are involved in resistance to cercosporin and other singlet oxygen-generating photosensitizers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 2001; 39(3):127-136.
- (136) Vido K, Spector D, Lagniel G, Lopez S, Toledano MB, Labarre J. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2001; 276(11):8469-8474.
- (137) Vilela C, Linz B, Rodrigues-Pousada C, McCarthy JE. The yeast transcription factor genes *YAP1* and *YAP2* are subject to differential control at the levels of both translation and mRNA stability. *Nucleic Acids Res* 1998; 26(5):1150-1159.
- (138) Vilela C, Ramirez CV, Linz B, Rodrigues-Pousada C, McCarthy JE. Post-termination ribosome interactions with the 5'UTR modulate yeast mRNA stability. *EMBO J* 1999; 18(11):3139-3152.
- (139) Wehrschutz-Sigl E, Jungwirth H, Bergler H, Hogenauer G. The transporters Pdr5p and Snq2p mediate diazaborine resistance and are under the control of the gain-of-function allele *PDR1-12*. *Eur J Biochem* 2004; 271(6):1145-1152.
- (140) Wemmie JA, Steggerda SM, Moye-Rowley WS. The *Saccharomyces cerevisiae* AP-1 protein discriminates between oxidative stress elicited by the oxidants H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and diamide. *J Biol Chem* 1997; 272(12):7908-7914.
- (141) Wemmie JA, Szczypka MS, Thiele DJ, Moye-Rowley WS. Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, *YCF1*. *J Biol Chem* 1994; 269(51):32592-32597.
- (142) Wemmie JA, Wu AL, Harshman KD, Parker CS, Moye-Rowley WS. Transcriptional activation mediated by the yeast AP-1 protein is required for normal cadmium tolerance. *J Biol Chem* 1994; 269(20):14690-14697.
- (143) Wendler F, Bergler H, Prutej K, Jungwirth H, Zisser G, Kuchler K et al. Diazaborine resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals a link between YAP1 and the pleiotropic drug resistance genes *PDR1* and *PDR3*. *J Biol Chem* 1997; 272(43):27091-27098.
- (144) Westwater J, McLaren NF, Dormer UH, Jamieson DJ. The adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to mercury exposure. *Yeast*. 2002 Feb;19(3):233-9. *Yeast* 2002; 19(3):233-239.

- (145) Wheeler GL, Trotter EW, Dawes IW, Grant CM. Coupling of the transcriptional regulation of glutathione biosynthesis to the availability of glutathione and methionine via the Met4 and Yap1 transcription factors. *J Biol Chem* 2003; 278(50):49920-49928.
- (146) Wiatrowski HA, Carlson M. Yap1 accumulates in the nucleus in response to carbon stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 2003; 2(1):19-26.
- (147) Williams KE, Cyert MS. The eukaryotic response regulator Skn7p regulates calcineurin signaling through stabilization of Crz1p. *EMBO J* 2001; 20(13):3473-3483.
- (148) Winge DR, Jensen LT, Srinivasan C. Metal-ion regulation of gene expression in yeast. *Curr Opin Chem Biol* 1998; 2(2):216-221.
- (149) Wolfger H, Mahe Y, Parle-McDermott A, Delahodde A, Kuchler K. The yeast ATP binding cassette (ABC) protein genes *PDR10* and *PDR15* are novel targets for the Pdr1 and Pdr3 transcriptional regulators. *FEBS Lett* 1997; 418(3):269-274.
- (150) Wotherspoon AC. Gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue and *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Med* 1998; 49:289-299.
- (151) Wu A, Wemmie JA, Edgington NP, Goebel M, Guevara JL, Moye-Rowley WS. Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *J Biol Chem* 1993; 268(25):18850-18858.
- (152) Wu A, Wemmie JA, Edgington NP, Goebel M, Guevara JL, Moye-Rowley WS. Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *J Biol Chem* 1993; 268(25):18850-18858.
- (153) Wu AL, Moye-Rowley WS. *GSH1*, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Cell Biol* 1994; 14(9):5832-5839.
- (154) Wysocki R, Bobrowicz P, Ulaszewski S. The *Saccharomyces cerevisiae* *ACR3* gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *J Biol Chem* 1997; 272(48):30061-30066.
- (155) Wysocki R, Fortier PK, Maciaszczyk E, Thorsen M, Leduc A, Odhagen A et al. Transcriptional activation of metalloloid tolerance genes in *Saccharomyces cerevisiae* requires the AP-1-like proteins Yap1p and Yap8p. *Mol Biol Cell* 2004.
- (156) Yang X, Talibi D, Weber S, Poisson G, Raymond M. Functional isolation of the *Candida albicans* *FCR3* gene encoding a bZip transcription factor homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Yap3p. *Yeast* 2001; 18(13):1217-1225.
- (157) Yoo HS, Cooper TG. Sequences of two adjacent genes, one (*DAL2*) encoding allantoicase and another (*DCG1*) sensitive to nitrogen-catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 1991; 104(1):55-62.

- (158) Zhang L, Hach A. Molecular mechanism of heme signaling in yeast: the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56(5-6):415-426.
- (159) Zhang L, Hach A. Molecular mechanism of heme signaling in yeast: the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56(5-6):415-426.
- (160) Zhao XJ, Raitt D, Burke V, Clewell AS, Kwast KE, Poyton RO. Function and expression of flavohemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a role in the oxidative stress response. *J Biol Chem* 1996; 271(41):25131-25138.
- (161) Zhou W, Edelman GM, Mauro VP. Transcript leader regions of two *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs contain internal ribosome entry sites that function in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(4):1531-1536.
- (162) Zhu X, Lee HG, Raina AK, Perry G, Smith MA. The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals* 2002; 11(5):270-281.



